

ZEITSCHRIFT FÜR BIOLOGIE

Unter Mitarbeit von

E. Bauereisen, Leipzig - M. H. Fischer, Berlin-Dahlem - A. Jarisch, Innsbruck - L. Lendle,
Göttingen - H. Lieb, Graz - H. Lullies, Kiel - R. Rigler, Graz - H. Schaefer, Heidelberg -
F. Scheminzky, Innsbruck - H. Schriever, Mainz - G. Schubert, Wien - E. Schütz, Münster -
H. Weber, Heidelberg - K. Wezler, Frankfurt/Main - E. Wöhlisch, Würzburg

herausgegeben von

A. W. FORST - B. ROMEIS - R. WAGNER

113. Band · Heft 1

Oktober 1961 *63*



Urban & Schwarzenberg · München und Berlin 1961

Inhalt (Seiten 1—80)

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Graz/Österr.

- Doz. Dr. H. G. Klingenberg und Dr. F. Müller, Untersuchungen zur Wirkung von Acridinorange und Protamin auf das Membranpotential der markhaltigen Nervenfasern. Mit 4 Abbildungen 1

Aus dem Zoologischen Institut und dem Institut für animalische Physiologie der Universität Frankfurt/Main

- Dr. Hanskurt Müller, Über die Entstehung der UV-Stasen in den Kapillaren der Froschschwimmhaut. Mit 9 Abbildungen 9
- , Über eine Methode zur Durchströmungsregistrierung in einzelnen Kapillaren. Mit 10 Abbildungen 39

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

- Dr. C. Bommert, Mechanische Eigenschaften des Herzmuskels im Zustand der Kontraktur. Mit 6 Abbildungen 58

Aus dem Histologisch-Embryologischen Institut der Universität Lausanne/Schweiz

- Prof. Dr. O. Bucher und Dr. Ph. Grandjean, Zur Frage der Angriffspunkte des antidiuretischen Hormons in der Niere. Mit 1 Abbildung 67

Aus dem Institut für Veterinär-Bakteriologie, Pleven/Bulgarien

- Dr. Chr. Petroff, Zur Problematik der biochemischen Empfindlichkeit von *Trichomonas foetus* nach Beeinflussung mit Ultraschall. Mit 1 Abbildung 77

Einbanddecken

für Band 112 und frühere Bände sind lieferbar.

Preis je Decke DM 3.—

Urban & Schwarzenberg · München und Berlin

Schriftleitung: Prof. Dr. B. Romeis, Institut für Histologie und experimentelle Biologie, München 15, Pettenkoferstr. 11, Ruf 5 40 84.

Manuskripte sind zu schicken:

von Arbeiten experimentell-biologischen Inhalts an Prof. Benno Romeis, Institut für Histologie und experimentelle Biologie, München 15, Pettenkoferstr. 11, Ruf 53 40 84, von Arbeiten physiologischen und physiologisch-chemischen Inhalts an Prof. Richard Wagner, Physiologisches Institut, München 15, Pettenkoferstraße 12, Ruf 55 34 87, von Arbeiten pharmakologischen Inhalts an Prof. August Wilhelm Forst, Pharmakologisches Institut, München 15, Nußbaumstr. 28, Ruf 55 10 34.

Erscheinungsweise: Die Zeitschrift erscheint in Heften von etwa 5 Druckbogen; je 6 Hefte bilden einen Band.

Bezugspreis: Der Preis beträgt für ständige Bezieher je Heft DM 12.50 und je Band DM 75.—. Einzelpreis des Heftes DM 14.—. Einbanddecken DM 3.— je Band.

Anzeigen: Aufträge an den Verlag Urban & Schwarzenberg, München 15, Pettenkoferstraße 18, erbeten.

Alle Rechte, auch die des Nachdrucks, der photomechanischen Wiedergabe und der Übersetzung, behalten sich Urheber und Verleger vor. Es ist insbesondere nicht gestattet, ohne Genehmigung des Verlages dieses Heft, einzelne Beiträge oder Teile daraus auf photomechanischem Wege (Photokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

Aus dem Physiologischen Institut der Universität Graz
(Vorstand: Prof. Dr. R. Rigler)

Untersuchungen zur Wirkung von Acridinorange und Protamin auf das Membranpotential der markhaltigen Nervenfasern

Von H. G. Klingenberg und F. Müller

Eingegangen am 10. April 1961

Mit 4 Abbildungen

Eine Anzahl organischer, basischer Stoffe, u. a. Acridinorange (AO) und Protamin erregen den Uterus des Meerschweinchens und veranlassen ihn zu Kontraktionen⁴. Da diese sog. BS-Kontraktionen stets mit einer Anreicherung der basischen Substanzen im Zellkern der Muskelfasern verbunden sind, gewinnt man den Eindruck, daß der Zellkern an der Auslösung dieser Kontraktionen beteiligt ist^{5,6}. Die bisherigen Experimente ergaben ferner Hinweise, daß die vermutete Zellkernwirkung nur dann zur Geltung kommt, wenn sich die Muskelmembran in einem erregbaren Zustand befindet⁶.

Da jeder Stoff, um in die Zelle einzudringen, die Muskelfasermembran passieren muß, erhebt sich die Frage, welche Wirkungen basische Stoffe an der Membran selbst hervorrufen und ob durch eine eventuell direkte Membranwirkung das Auftreten der BS-Kontraktionen erklärbar ist.

Gegen einen ausschließlichen Membraneffekt sprechen zwar einige Gründe: So haben Mond und Hoffmann¹⁰ sowie Sollner¹² nachgewiesen, daß primär kationenpermeable Kollodiummembranen selektiv anionenpermeabel werden, wenn man sie mit Rhodamin oder Protamin imprägniert. Dieser Befund läßt, wenn man ihn auf die Zellmembran überträgt, eine Erschwerung des Errungsvorganges und daher eher eine Hemmung der Muskelmotorik erwarten. Überlegungen auf Grund der „Fixed charge“-Theorie (Teorell)¹⁶ führten zu demselben, dem vorliegenden Beobachtungsmaterial zuwiderlaufenden Schluß.

Andererseits hat Lehmann⁷ die Wirkung einiger basischer Farbstoffe auf das Membranpotential der quergestreiften Muskelfaser untersucht und einen depolarisierenden Effekt gefunden. Allerdings bedurfte es hier-

zu im Vergleich zu den zitierten eigenen Versuchen höherer Konzentrationen und wesentlich längerer Einwirkungszeiten. Dieser Umstand ermöglichte es dem Autor auch die diachrom nachweisbare Färbung der Zellkerne festzustellen, während wir uns stets des fluoreszenz-mikroskopischen Nachweises bedienen mußten, um die eingedrungenen Stoffe zu erfassen. Im Hinblick auf die jetzt interessierende Frage lassen sich die Befunde von *Lehmann* nicht heranziehen, zumal auch er annimmt, daß der Abfall des Membranpotentials kaum einer direkten Wirkung der Farbstoffe auf die Membran sondern Stoffwechselschädigungen der Zelle zuzuschreiben ist.

Um den Einfluß, den basische Stoffe auf die Zellmembran ausüben, ohne Komplikation durch Zellkernwirkungen erfassen zu können, erschien es zweckmäßig, den Effekt derartiger Substanzen auf das Membranpotential des Nerven zu untersuchen.

Methode

Die Experimente wurden nach der von *Stämpfli*¹³ und *Straub*¹⁵ ausführlich beschriebenen Saccharose-Trennwand-Methode an Faserbündeln des *N. tibialis* des Frosches (*Rana esculenta*) während der Sommer- und Herbstmonate bei Zimmertemperatur ausgeführt.

Als elektrisches Anzeigergerät verwendeten wir ein nach dem Zerhackerprinzip arbeitendes pH-Meter (Radiometer, Type 22), dessen Eingangswiderstand ca. 10^{11} Ohm beträgt. Der für den Zweck nicht optimale Eingangswiderstand bedingte, daß die auftretenden Potentialdifferenzen zu niedrig gemessen wurden. Für vergleichende Messungen, um die es sich in diesen Versuchen vor allem handelt, gewährt der Apparat eine genügend zuverlässige Ablesung. Entsprechend der Konstruktion des Meßgerätes wurde das Potential über zwei gesättigte Kalomelektroden abgeleitet. Alle zur Versuchsanordnung gehörigen Geräte befanden sich in einem Faradayschen Käfig.

Folgende Lösungen wurden verwendet (Angaben in mM/l):

1. Ringer-Lösung: Na^+ 112,9; K^+ 2,5; Ca^{++} 2,1; Cl^- 115,1; HCO^- 2,4.
2. AO-Ringer-Lösung: wie 1 plus 2 mg AO/100 ml.
3. Protamin-Ringer-Lösung: wie 1 plus 2 mg oder 10 mg Protamin/100 ml.
4. Isotone KCl-Lösung: KCl 117.
5. K-Ringer-Lösung: Na 95,4; K 20,0 im übrigen wie 1.
6. K-Protamin-Ringer-Lösung: wie 5 plus 10 mg Protamin/100 ml.

Zwischen den Lösungen 1 und 2 bzw. 3 sowie zwischen 5 und 6 war kein Potential meßbar.

Bei den Versuchen wurde zunächst abgewartet, bis sich am Meßgerät ein konstanter Wert bei Bespülung beider Nervenstellen mit Ringer-Lösung eingestellt hatte. Darauf wurde der Nerv an einer Stelle mit isotoner KCl-Lösung depolarisiert und anschließend entweder mit Ringer-Lösung oder auch gleich mit AO- oder Protamin-Ringer-Lösung gespült. Die während dieser Maßnahmen vom Meßgerät angezeigten Potentialänderungen wurden in Intervallen von einer halben bis einer Minute abgelesen. Bei den Experimenten mit K- und K-Protamin-Ringer-Lösung wurden beide Lösungen unmittelbar nacheinander einwirken gelassen.

Ferner wurde die Erregbarkeit und Leitungsfähigkeit eines Ischiadicus-Gastrocnemius-Präparates unter dem Einfluß von AO- bzw. Protamin-Ringer-Lösung geprüft. Der Nerv befand sich dazu in einem zweikammrigen Paraffin-

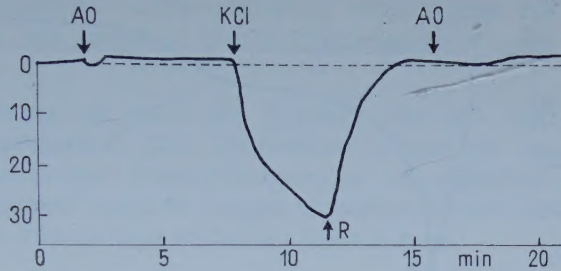


Abb. 1. Wirkung von AO-Ringer auf das Membranpotential. Der polarisierende Effekt ist vor und nach einer Depolarisation mit isotoner KCl-Lösung gerade erkennbar. Die Ordinate gibt in willkürlichen Einheiten (s. Text) die Abweichung des Membranpotentials von der Ausgangslage an. Abszisse: Zeit in Minuten.

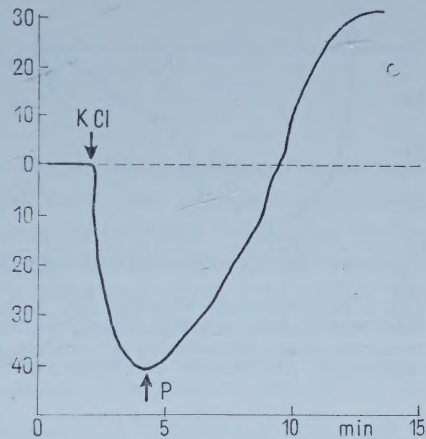


Abb. 2. Polarisierende Wirkung von Protamin nach einer Depolarisation mit isotoner KCl-Lösung; Protaminkonzentration 10 mg/100 ml Ringer-Lösung

trog. Am Boden jeder Kammer waren ein Paar Platin-Reizelektroden befestigt, über die der Nerv gelegt war. Auf den Nerv wurde in jeder Kammer ein mit Ringer- bzw. AO- oder Protamin-Ringer-Lösung durchfeuchtetes Wattebäuschchen gelegt. Gereizt wurde mit Einzelreizen von 0,5 msec Dauer.

Ergebnisse

Dem relativen Charakter der Meßmethode Rechnung tragend, sind in den folgenden Abbildungen auf den Ordinaten nicht Millivolt sondern die ihnen proportionalen Zeigerausschläge in Teilstrichen der Ableseskala aufgetragen. Ohne Berücksichtigung der oben erwähnten, einschränkenden Bedingungen wäre die Skaleneinheit gleich 0,5 mV.

Isotone KCl-Lösung verursacht eine rasche Depolarisation, welche durch nachfolgende Spülung mit Ringer-Lösung ganz oder fast vollständig aufgehoben wird. AO-Ringer-Lösung bewirkt einen schwach hyperpolarisierenden Effekt; das Potential steigt stets um 1 bis 2 Skalenteile an. Eine Depolarisation ist hiebei nie zu beobachten (Abb. 1).

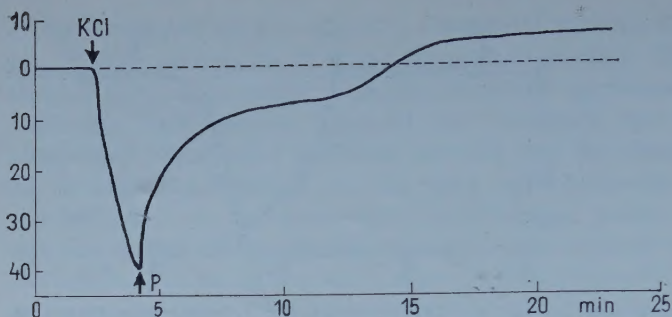


Abb. 3. Polarisierende Wirkung von Protamin nach einer Depolarisation mit isotoner KCl-Lösung; Protaminkonzentration 2 mg/100 ml Ringer-Lösung.

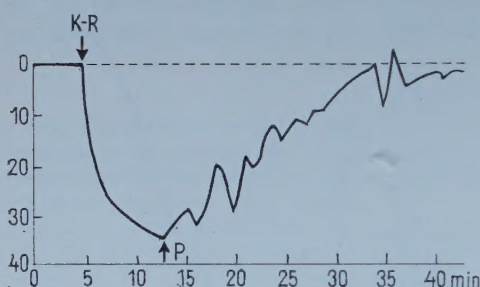


Abb. 4. Polarisierende Wirkung von Protamin bei erhöhter $[K^+]$: Ab K-R wurde der Nerv mit 20 mMol K-Ringer-Lösung und darauf mit der gleichen Lösung gespült, welche zusätzlich 10 mg Protamin/100 ml enthielt. Der Abszissenmaßstab ist gegenüber den vorangehenden Abbildungen verkleinert; der Ablauf der Polarisation ist also langsamer.

Die unter AO-Einfluß nur angedeutete Steigerung des Membranpotentials ist bei Verwendung von Protamin-Ringer-Lösung sehr ausgeprägt, wobei die Hyperpolarisation durch 10 mg/100 ml noch stärker in Erscheinung tritt als bei 2 mg Protamin/100 ml. Wirkungsunterschiede zwischen diesen beiden Lösungen sind auch dann feststellbar, wenn man sie auf einen durch isotone KCl-Lösung depolarisierten Nerven wirken läßt. Bei Bespülung mit der stärker konzentrierten Lösung ist der Verlauf der Repolarisationskurve nicht, wie üblich, konvex sondern konkav gegen die Ordinate (Abb. 2). Die Wiederherstellung des Potentials ist demnach zunächst verzögert, nimmt darauf rasch zu und geht anschließend stetig in die Hyperpolarisation über. Die schwächer konzentrierte Protamin-Ringer-Lösung verändert den Repolarisationsverlauf anfänglich nicht erkennbar. Erst zu einem späteren Zeitpunkt setzt eine geringgradige Verzögerung ein, und schließlich strebt die Kurve in flachem, stetigen Anstieg dem über dem Ausgangswert liegenden Membranpotential zu. (Abb. 3).

Abb. 4 zeigt das Ergebnis eines Versuches, bei dem der Nerv durch K-Ringer-Lösung depolarisiert und anschließend mit K-Protamin-Ringer-Lösung gespült wurde. Man erkennt, daß trotz der fortbestehenden K^+ -

Wirkung eine Polarisation eintritt, welche allerdings nicht immer den Ausgangswert erreicht und von einzelnen Depolarisationsphasen unterbrochen wird.

Die Erregbarkeit des Nerven ist unter der Wirkung von AO- oder Protamin-Ringerlösung herabgesetzt. Der Unterschied gegenüber den in Ringer-Lösung vorgenommenen Kontrollmessungen ist signifikant ($p < 0,001$). Die Leitungsfähigkeit schien in einigen Versuchen vermindert zu sein; jedoch ließ sich der Unterschied statistisch nicht sichern.

Diskussion

Nach den Untersuchungen von *Hodgkin* und *Katz*³ am Loligo-Axon läßt sich das Membranpotential nach folgender Formel berechnen:

$$E_M = \frac{RT}{zF} \ln \frac{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_e}{P_K [K^+]_e + P_{Na} [Na^+]_e + P_{Cl} [Cl^-]_i}$$

P_K , P_{Na} und P_{Cl} bedeuten hierin die Permeabilitätskonstanten der einzelnen Ionen. Für das Verhältnis gilt nach den genannten Autoren: $P_K : P_{Na} : P_{Cl} = 1 : 0,04 : 0,45$. In allen unseren in Ringer-Lösungen durchgeführten Versuchen sind die Ionenkonzentrationen im Außenmedium konstant und betragen: $[K^+]_e$ 2,5; $[Na^+]_e$ 112,9 und $[Cl^-]_e$ 115,1 mMol. Für die intraaxonalen Ionenkonzentrationen geben *Schmidt* und *Stämpfli*¹¹ an: $[K^+]_i$ 110; $[Na^+]_i$ 40 und $[Cl^-]_i$ 2,5 mMol. Auf Grund dieser Daten errechnet man nach obiger Formel bei einer Temperatur von 20° C ein Membranpotential von 76 mV.

Da unter dem Einfluß von AO bzw. Protamin das Membranpotential bei gleichbleibendem Außenmedium ansteigt, kann diese Änderung theoretisch dadurch zustandekommen, daß entweder die Innenkonzentrationen der Ionen oder die Permeabilitätskonstanten eine Änderung erfahren. Veränderungen der ionalen Konzentrationen im Inneren würden bevorzugt das Kalium betreffen, welches gegen einen der basischen Stoffe ausgetauscht werden könnte. Abgesehen davon, daß infolge der sehr geringen Konzentration dieser Stoffe der Austausch nur unbedeutend wäre, würde hieraus ein Absinken des Membranpotentials resultieren. Der beobachtete Anstieg des Potentials ist daher mit größerer Wahrscheinlichkeit auf Änderungen der Permeabilitätskonstanten zu beziehen.

Das Potential würde gemäß der Gleichung von *Hodgkin* und *Katz* ansteigen, falls sich eine Tendenz zur Bildung eines reinen Kalium- oder Chlorpotentials einstellt. Nach den angegebenen Werten beträgt das K^+ -Potential ca. 95, das Cl^- -Potential etwa 96 mV. Die Entscheidung, zu welchem der beiden Potentiale die Membran tendiert, ist auf Grund der Versuchsanordnung zugunsten des Cl^- -Potentials zu fällen. Durch das hier geübte Verfahren ließen sich die unvermeidbaren Komplikationen um-

gehen, die immer auftreten, wenn man die Wirkung verschiedener $[Cl]_e$ prüfen will.

Man darf daher annehmen, daß die beiden untersuchten basischen Substanzen der Nervenmembran eine positive Ladung erteilt haben, woraus eine gesteigerte Cl^- und verminderte K^+ - und auch Na^+ -Permeabilität resultiert.

In diesem Sinne spricht auch das in Abb. 4 dargestellte Versuchsergebnis. Die durch die erhöhte $[K^+]_e$ bewirkte Depolarisation geht unter der Protaminwirkung langsam zurück, da das Membranpotential in Richtung eines Cl^- -Potentials tendiert. Wenn diese Ergebnisse nicht immer so markant sind, ist das vor allem darauf zurückzuführen, daß sich unter der vorausgehenden und fortdauernden Bespülung des Nerven mit 20 mMol $[K^+]_e$ ein Gleichgewicht eingestellt hat, das durch Protamin nur wenig gestört werden kann. Analoge Beobachtungen haben *Dettbarn* und *Stämpfli*¹ anlässlich ihrer Messungen über die pH-Wirkung auf das Membranpotential gemacht. Zwischen ihren Ergebnissen, wonach die pH-Senkung zur Abnahme der K^+ -Permeabilität führt, und den hier beschriebenen besteht eine Gemeinsamkeit: In beiden Fällen wächst, eine Ampholytnatur der Membran vorausgesetzt, die positive Nettoladung der Membran. In dieser Hinsicht, der Positivierung der Membran, ist die Analogie unserer Versuchsergebnisse zu den eingangs zitierten Befunden von *Mond* und *Hoffmann*¹⁰ sowie von *Sollner*¹² offensichtlich; Stoffe derselben Art, u. a. auch Protamin, steigern die Permeabilität der Kolodiummembran für Anionen und hemmen die Durchlässigkeit für Kationen.

Die Besonderheiten des zeitlichen Verlaufs der Polarisation unter der Wirkung höherer Protaminkonzentrationen bedürften einer gesonderten experimentellen Analyse, um näher diskutiert werden zu können.

Stämpfli^{11, 14} hat die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß das Ruhepotential des Nerven eher ein Cl^- - als ein K^+ -Potential sein könnte. Als einen der wesentlichen Punkte seiner Argumentation hebt er hervor, daß die Permeabilitätskonstanten, speziell P_K keine konstante Größe darstellen. P_K steht wahrscheinlich in einer exponentiellen, umgekehrt proportionalen Abhängigkeit zum Membranpotential.

Unsere Interpretation ist dieser von *Stämpfli* sowie *Lüttgau*⁸ und *Meves*⁹ geäußerten Ansicht sehr ähnlich; nur ist hier die Änderung des Membranpotentials als abhängige Variable vom Verhältnis der Permeabilitätskonstanten gedeutet worden. Diese Auffassung ergibt sich aus unserer Versuchsanordnung, derzufolge die Ionenkonzentrationen beiderseits der Membran als konstant angesehen werden können. Auch *Dettbarn* und *Stämpfli*¹ ziehen aus ihren Ergebnissen über die pH-Abhängigkeit des Membranpotentials diesen funktionellen Zusammenhang in Erwägung.

Nebenbei sei bemerkt, daß es, falls das Membranpotential eine Funktion der Permeabilitätskonstanten ist, denkbar wäre, daß bei steigender Anionen- und sinkender Kationenpermeabilität das Membranpotential sinkt. Dies würde dann eintreten, wenn bei entsprechender Cl^- -Ionenver-

teilung zu beiden Seiten der Membran das Cl^- -Potential kleiner wäre als jenes, an dessen Aufrechterhaltung alle Ionen beteiligt sind. Ob diese formale Überlegung zutrifft, kann derzeit nicht entschieden werden.

Der eben dargelegte Unterschied bedeutet keineswegs, daß sich die beiden Betrachtungsweisen ausschließen. Es hängt, wie leicht einzusehen ist, von der Situation ab, ob man das Membranpotential als Funktion der Permeabilitätskonstanten oder diese als Funktion des Membranpotentials auffassen soll. Die letztgenannte Beziehung trifft für die unter AO- und Protaminwirkung gefundene Herabsetzung der Erregbarkeit des Nerven zu. Das Membranpotential muß, bezogen auf seinen Ausgangswert, stärker gesenkt werden als bei den weniger polarisierten Kontrollen, um die Kationenpermeabilität auf den für den Erregungsablauf notwendigen Wert zu erhöhen.

Versucht man von den mitgeteilten Befunden auf das Ruhepotential in gewöhnlicher Ringer-Lösung zu schließen, so läßt sich nur folgern, daß in diesem Milieu P_{Cl} kleiner und/oder P_{K} größer ist als in AO- bzw. Protamin-Ringer-Lösung. Ob, wie es nach neueren Messungen von *Hodgkin* und *Horowicz*² vorstellbar wäre, in reiner Ringer-Lösung $P_{\text{Cl}} > P_{\text{K}}$ ist, läßt sich aus den vorliegenden Resultaten nicht ableiten. Daher sei auf eine Erörterung, ob das Ruhepotential ein K^+ - oder ein Cl^- -Potential ist, verzichtet.

Nach allgemeiner Erfahrung weist das Verhalten der Nerven- und Muskelmembran keine grundsätzlichen Unterschiede auf. Die am Anfang gestellte Frage, ob direkte Membranwirkungen allein das Auftreten der BS-Kontraktionen am Uterus und an der *Taenia coli* zu erklären vermögen, kann gemäß den experimentellen Befunden verneint werden. Wenn es dennoch zur Erregung kommt, so wird man als deren Ursache eine indirekte Beeinflussung der Membran durch intrazelluläre Vorgänge annehmen dürfen. Die Wirkung dieser Prozesse müßte den jetzt beschriebenen Effekten entgegengerichtet, d. h. erregungsfördernd sein. Wie eingangs erwähnt, steht der Zellkern, in dem die basischen Stoffe angereichert werden, hiebei im Vordergrund des Interesses.

Fräulein cand. med. *Anna Fink* danken wir für wertvolle experimentelle Mitarbeit.

Zusammenfassung

Das Membranpotential markhaltiger Nervenfasern des Frosches wird durch Acridinorange und Protamin erhöht. Die Erregbarkeit wird durch diese Stoffe signifikant vermindert. Die Befunde werden als Tendenz zur Ausbildung eines Cl^- -Potentials interpretiert, welche als Folge gesteigerter Anionen- und geminderter Kationenpermeabilität in Erscheinung tritt.

Summary

The membrane potential of the myelinated nerve-fibres of the frog is increased by acridine-orange and protamine. The excitability is diminished by those drugs. The results are interpreted as a tendency towards a Cl^- -potential, due to an increased anion- and decreased cation-permeability.

Résumé

Le potentiel de la membrane du nerf myéliné de la grenouille est élevé par l'acridine-orange et par la protamine. L'excitabilité est diminuée significativement par ces drogues. Les résultats sont interprétés selon une tendance d'établir un potentiel de Cl^- , dû au changement de la perméabilité, qui est augmentée pour les anions et diminuée pour les cations.

Schrifttum

- 1 Dettbarn, W.-D. u. R. Stämpfli, *Helvet. physiol. pharmacol. acta* **15** (1957): C 16 — 2 Hodgkin, A. L. u. P. Horowicz, *J. Physiol.* **148** (1959): 127 — 3 Hodgkin, A. L. u. B. Katz, *J. Physiol.* **108** (1949): 37 — 4 Klingenberg, H. G., *Zschr. Biol.* **108** (1956): 312 — 5 Klingenberg, H. G. u. W. Lipp, *Exper. Cell. Res.* **18** (1960): 580; *Zschr. Biol.* **111** (1960): 428; dies. u. F. Müller, *Pflügers Arch.* **272** (1960): 46; *Exper. Cell Res.* **23** (1961): 1 — 6 Klingenberg, H. G. u. W. Lipp, *Zschr. Biol.* **112** (1961): 380 — 7 Lehmann, H. J., *Pflügers Arch.* **259** (1954): 294 — 8 Lüttgau, H. Ch., *Pflügers Arch.* **271** (1960): 613 — 9 Meves, H., *Pflügers Arch.* **271** (1960): 655 — 10 Mond, R. u. F. Hoffmann, *Pflügers Arch.* **220** (1928): 194 — 11 Schmidt, H. u. R. Stämpfli, *Helvet. physiol. pharmacol. acta* **17** (1959): 62 — 12 Sollner, K., *Electrochemistry in Biology and Medicine*, hgb. von Th. Shedlovsky, New York, London 1955, S. 33 — 13 Stämpfli, R., *Helvet. physiol. pharmacol. acta* **14** (1956): 93 — 14 ders., ebda. **16** (1958): 127, C 83 — 15 Straub, R., *Helvet. physiol. pharmacol. acta* **14** (1956): 1 — 16 Teorell, T., *Progress in Biophysics* **3** (1953): 305.

Aus dem Zoologischen Institut (Direktor: Prof. Dr. H. Giersberg) und dem
Institut für animalische Physiologie (Direktor: Prof. Dr. K. Wezler) der
Universität Frankfurt (Main)

Über die Entstehung der UV-Stasen in den Kapillaren der Froschschwimmhaut * ** ***

Von Hanskurt Müller

Mit 9 Abbildungen

Eingegangen am 12. April 1961

Einleitung

Dreyer und Jansen ¹⁴ beschrieben 1905 als Reaktionen der Froschungenkapillaren auf UV-Bestrahlungen zunächst eine Erweiterung, später das Auftreten von Stasen. Diese traten auch dann auf, wenn die Zunge während der UV-Bestrahlung durch Quetschen nur wenig Blut enthielt (Jansen ³²).

Merker ^{49, 50} fand eine Blutzerstörung bei Kaulquappen nach UV-Bestrahlung. Giersberg und Dorn ¹⁹ beobachteten eine Eindickung des Blutes UV-bestrahlter Frösche. Giersberg und Hanke ²⁰ fanden, daß vor allem das kurzwellige UV bis etwa 300 m μ Stasen hervorruft. Sie können sowohl eine nervöse Steuerung ausschließen als auch eine Auslösung durch Freisetzung von Adrenalin oder Histamin im UV-bestrahlten Gebiet. Von den beiden noch verbleibenden Deutungsmöglichkeiten: Veränderungen im Blut oder Veränderungen der Gefäßpermeabilität, geben sie der letzteren den Vorzug, denn die Verweilzeit des Blutes ist gering, verglichen mit der Zeit, die bis zum Eintritt der Stasen vergeht. Graul ²² hat Permeabilitäts erhöhungen der Froschhaut im Anschluß an UV-Bestrahlung beschrieben. Bucker und Hanke ⁶ führen die Untersuchung über die Wellenlängenabhängigkeit fort und finden die Wellenlängen 280 und 297 m μ am wirksamsten für die Staseentstehung. Eine Zunahme

* Herrn Prof. Dr. H. Giersberg zum 70. Geburtstag gewidmet.

** Diese Arbeit erhielt den 2. Preis der Hanauer Preisstiftung für das Jahr 1960.

*** Die Arbeit wurde unterstützt vom European Research Office unter Contract No. DA — 91 — 591 — EUC — 1302 OI — 4171 — 60.

der Durchströmungsgeschwindigkeit ist auch noch bei größeren Wellenlängen zu beobachten. Mittels spektraler Absorptionsmessungen an der Froschschwimmhaut schätzen die Autoren die Strahlungsenergie ab, die zur Entstehung der Stasen erforderlich ist.

Die hier entwickelte Methode⁵¹ zur Messung der Strömungsgeschwindigkeit und des Hämatokrits in einer individuellen Kapillare schien nun geeignet, die Hypothese der erhöhten Kapillarpermeabilität als Entstehungsursache der UV-Stasen zu prüfen. Eine Erhöhung des Ausstromes durch die Kapillarwand muß eine Erhöhung des Hämatokrits nach sich ziehen.

Tiermaterial und Methoden

Vom 13. 11. 1957 bis 12. 5. 1960 wurden 337 Versuche durchgeführt. In 157 Versuchen wurden 411 verschiedene Areale UV-bestrahlt.

Verwendet wurden vorwiegend *Rana temporaria*, und zwar mittel- bis hellbraune Tiere sowohl aus Frischfängen als auch Kellerfrösche. Die Gewohnungstemperatur⁵³ der Tiere lag im Winter bei 10°–12° C, im Sommer bei 16°–19° C (Froschkeller des Instituts). Daneben wurden Versuche mit *Rana esculenta* und *Xenopus laevis* gemacht. Letztere wurden bei einer Wassertemperatur von 18°–22° C gehalten und regelmäßig mit Leber gefüttert.

Die Nebenwirkungen bzw. Brauchbarkeit verschiedener Ruhigstellungsmittel für diese speziellen Untersuchungen wurden in Anfangsversuchen geklärt. In fast allen späteren Versuchen wurde die Ruhigstellung durch Bis-cholin-succinat-dichlorid, Abkürzung Succ. (Succinyl-Asta „forte“), bewirkt, wobei die Dosierung je nach Jahreszeit zwischen 2 mg (Winter bis Frühjahr) und 6 mg (Spätsommer bis Herbst) lag. Die Injektion erfolgte (auch bei allen anderen angewandten Pharmaka) in den Rückenlymphsack vom Oberschenkel her, um Verluste durch Wiederaustreten zu vermeiden.

Da bei den durch Cur. oder Succ. inaktivierten Tieren unter der allgemeinen Lähmung auch die Lungenatmung ausfällt, wurde der Einfluß einer zusätzlichen O₂-Versorgung untersucht. Dabei zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Hautatmung¹⁰ der Tiere zwischen ruhender und strömender Luft, der größer war als der zwischen strömender Luft und strömendem Sauerstoff.

Alle UV-bestrahlten Tiere lagen während des Versuches mit Seiten- und Rückenhaut in einem wasserdampfgesättigten Luftstrom, mit der Bauchhaut in einem langsam fließenden, gegen Luftsauerstoff äquilibrierten Wasser.

Beobachtungen über O₂-Versorgung, Nebenwirkungen der Ruhigstellungsmittel wie über jahreszeitliche Veränderungen sollen später gesondert veröffentlicht werden, ebenso das umfangreiche EKG-Material und die Kapillarbeobachtungen, soweit diese nicht mit UV-Bestrahlungen im Zusammenhang stehen.

Absolutwerte der eingestrahlten UV-Energie können nicht angegeben werden. Der Energiefluß pro Flächeneinheit blieb in allen Versuchen gleich. Die spektrale Energieverteilung entspricht etwa der von Hanke²⁵ Tab. 1, Spalte 5 angegebenen.

Neben der subjektiven Beobachtung wurde mittels optisch-elektrischer Methoden⁵¹ folgende Größen während der Versuchsdauer fortlaufend registriert: Herzfrequenz, EKG-Amplitude, optische Dichte des bestrahlten Areals, Erythrocytengeschwindigkeit und Passagezahl sowie Hämatokrit in einer einzelnen Kapillare des Bestrahlungsareals.

Statistische Auswertung

Bei der Untersuchung individueller Kapillaren streuen die Versuchsergebnisse auf 3 verschiedenen Ebenen:

- a) durch die Reaktionsverschiedenheit der Frösche zu verschiedenen Jahreszeiten¹⁹,
- b) durch die Reaktionsunterschiede der einzelnen Tierindividuen,
- c) durch die vielfältigen Reaktionsweisen einzelner Kapillaren des gleichen Tieres^{44, 45, 64}.

Nur in einzelnen, oft bereits unphysiologischen Verhältnissen (z. B. Tween 80), ist ein gleichförmiges Verhalten von ganzen Kapillargruppen zu beobachten.

Als bestes Kriterium erwiesen sich die „Prozentsummen“. Für jede einzelne Bestrahlung wurde der Prozentsatz der stagnierenden Kapillaren (n) bezogen auf die Gesamtzahl (m) der Kapillaren des Areals in Abständen von 10 zu 10 Minuten errechnet. Auf diese Weise wurde Unabhängigkeit von der zufälligen Gesamtzahl der Kapillaren des Areals erreicht. (Die Anzahl der Kapillaren eines Areals von 0,32 mm Durchmesser schwankt etwa zwischen 6 und 26 Kapillaren mit einem Mittelwert von 11 Kapillaren.) Die Bestrahlungen dauerten 2 Stunden. Falls vorher schon alle Kapillaren stagnierten, wurde die Bestrahlung mit Erreichen der letzten Stase abgebrochen.

Die von 10 zu 10 Minuten ermittelten Prozentzahlen stagnierender Kapillaren wurden innerhalb einer Versuchsgruppe zu Mittelwerten zusammengefaßt und zur Errechnung der Streuung herangezogen. In den Abb. 5 bis 9 sind diese Prozentzahlen als Ordinatenwerte über der Zeit in 10 Minuten aufgetragen (Gesamtlänge der Zeitachse 2 Stunden). Die Fläche unter der Kurve ist also ein Maß für Durchblutungsausfall des bestrahlten Areals, gebildet aus dem Produkt der Zeit mit dem prozentualen Anteil ausgefallener Gefäße. Diese Flächenintegrale wurden — zusammen mit ihren Streuungen zur statistischen Sicherung verwendet und an der *Studentschen t-Verteilung*⁴⁷ geprüft. Nach der Art ihrer Ermittlung wurden diese Maßzahlen als „absolute Prozentsummen“ bezeichnet. Theoretisch liegen sie zwischen 0 (keine einzige Stase in 2 Stunden) und 1200 (alle Kapillaren stagnieren in den ersten 10 Minuten).

Die unterschiedliche Stasebereitschaft der einzelnen Tierindividuen geht jedoch bei kleinen Versuchsgruppen noch stark ein. Um ihren Einfluß zu vermindern, wurde für jedes Tierindividuum jener „Normierungsfaktor“ α ermittelt, der die „absoluten“ Prozentsummenmittelwerte seiner Kontrollbestrahlungen gerade zu 100 % macht. Dann wurden alle übrigen Prozentzahlen des gleichen Tieres mit diesem Faktor α „normiert“ (multiplikative Transformation der Y-Achse). Die so entstandenen Kurven des Zeitverlaufes werden als „normiert“ bezeichnet, ebenso wie die daraus errechneten statistischen Sicherungen.

Allgemeine Beobachtungen während der UV-Bestrahlung

Während der UV-Bestrahlungen wird die gesamte Schwimnhaut des bestrahlten Areals optisch dichter und zeigt bei (oder kurz nach) Eintritt der Stasen eine feinkörnige Struktur. Die vorher unsichtbaren Gefäßwände heben sich als stärker granulierte Bänder nach einer gewissen Bestrahlungszeit optisch deutlich ab, noch bevor die Mehrzahl der Gefäße des Gesichtsfeldes stagniert.

Bücker und Hanke⁶ haben ihre Absorptionsmessungen an größeren Arealen gemacht. Dabei wird die Veränderung des Expansionszustandes der Chromatophoren mitbestimmt. Die Veränderungen im bestrahlten

Gebiet sind nicht absolut scharf gegen das unbestrahlte abgegrenzt. Am Rand der bestrahlten Fläche liegt ein schmales Übergangsgebiet mit nach außen abnehmenden optischen Veränderungen, in dem noch eine träge Durchströmung bestehen bleibt. Jenseits dieses Saumes ist sowohl das optische Bild als auch die kapillare Durchströmung praktisch unverändert. Ob diese Übergangszone nur aus der Unschärfe der optischen Abbildung der Begrenzungsblende oder durch optische Brechung und Streuung im Gewebe oder durch Diffusion reaktionsauslösender Substanzen zu deuten ist, läßt sich bei der angewandten Methode nicht entscheiden.

Die Chromatophoren im Bestrahlungsareal sind zu Beginn der Bestrahlung meist noch weitgehend kontrahiert, obwohl das Areal 1 bis 2 Stunden vor Bestrahlungsbeginn einer recht intensiven Bestrahlung mit sichtbarem Licht, bis etwa 320 m μ ins UV reichend, ausgesetzt war.

Eine Expansion auf sichtbares Licht, wie sie Zettner⁶⁵ von ausgeschnittenen *R. escul.* Hautstücken beschreibt, ist also hier nicht erfüllt, zumal er die maximale Spektralempfindlichkeit im Grün findet. Die Reaktion der Chromatophoren der intakten, natürlich durchbluteten und innervierten *R. temp.*-Schwimmhaut entspricht an sich den Befunden Zettners, bis auf die Lage der maximalen spektralen Empfindlichkeit, die hier statt im Grün zwischen 320 und 260 m μ liegt. Die Frage, ob es sich dabei noch um eine physiologische Lichtreaktion oder schon um eine Schädigung handelt, muß offen bleiben. Schon kurze Zeit nach Beginn der Bestrahlung beginnen die Chromatophoren zu expandieren und erreichen im allgemeinen vor Ende der zweistündigen Bestrahlung eine maximale Expansion. Dabei liegen ihre Ausläufer oft die Kapillaren umgreifend. Auch diese Reaktion ist auf das bestrahlte Areal beschränkt, die Chromatophoren in unmittelbar benachbarten, unbestrahlten Gebieten verharren in ihrem Kontraktionszustand.

Die Beobachtung von Krogh³⁹, daß bereits ein zehnminütiger Durchblutungsstillstand zu einer Kontraktion der Chromatophoren führe, konnte nicht gemacht werden. Insbesondere zeigen Tiere mit nachlassender Durchblutung, die später eingehen, noch vor dem völligen Stillstand eine maximale Expansion auch ohne UV-Bestrahlung, die nach dem Stillstand der Durchblutung unverändert bestehen bleibt. Diese Expansion ist unabhängig von der Lichteinstrahlung, auch in dunklen Gebieten zu beobachten, so daß auch die Parallele zwischen den — nicht mehr durchbluteten — überlebenden Hautstücken von Zettner und der hier nicht mehr durchbluteten Schwimmhaut post mortem nichts deutet, da die Chromatophoren überlebender Hautstücke Licht zur Einleitung der Expansion brauchen, die der Schwimmhaut post mortem jedoch nicht.

Wiederholt wurde während einer Bestrahlung ein Schrumpfen des bestrahlten Areals beobachtet, wie es auch Hanke²³ bei der Untersuchung der histologischen Veränderungen in der UV-bestrahlten Schwimmhaut fand.

Das Verhalten der einzelnen Kapillaren nach Beginn der UV-Bestrahlung läßt sich in drei Gruppen teilen:

1. Innerhalb der ersten Minuten beginnt die Ery-Geschwindigkeit anzuwachsen, während der Hämatokrit langsam zurückgeht. Bei geringer Intensität der UV-Bestrahlung oder bei nur kurzzeitiger Bestrahlung mit höherer Intensität kann dieser Zustand erhöhter Geschwindigkeit und verminderten Hämatokrits für Stunden bestehen. Bei höherer Dosis (genügender Intensität, hinreichender Dauer) nimmt die Zahl der Ery-Passagen und damit der Hämatokrit wieder zu. Dann kommt es sehr plötzlich zu einer raschen Abnahme der Ery-Passagen und ihrer Geschwindigkeit. Die Erythrozyten beginnen Abrollbewegungen an der Gefäßwand, haften schließlich und führen Pendelbewegungen sehr kleiner Amplitude aus.
2. Die Durchströmungsgeschwindigkeit bleibt über längere Zeit nach Beginn der Bestrahlung konstant, um dann relativ plötzlich bei zunehmendem Hämatokrit in die Wandhaftung mit schließlichem Stagnieren überzugehen.
3. Bereits unmittelbar nach Beginn der Bestrahlung beginnt eine zunächst langsame Geschwindigkeitsabnahme, um dann plötzlich, wie in den anderen Fällen bereits beschrieben, in die Stagnation zu münden.

In einem Gebiet, dessen UV-Verbrennung mit dem völligen Durchströmungsstillstand im gesamten bestrahlten Bereich abgebrochen wird, kann es nach 8 bis 14 Stunden zu einer erneuten Durchströmung in den großen Gefäßen kommen. Dabei werden hohe Geschwindigkeiten bei sehr kleinem Hämatokrit beobachtet (d. h. die Erythrozyten kommen einzeln mit großem Abstand).

Bricht man die UV-Bestrahlung zu einem Zeitpunkt ab, in dem im bestrahlten Areal nur die kleinen Kapillaren („true capillaries“ — *Zweifach* ^{67, 68}) stagnieren, so beobachtet man zwar, daß auch noch in der ersten Zeit nach Ende der Bestrahlung vereinzelte Kapillaren stagnieren und die Strömungsgeschwindigkeit in den größeren Gefäßen zunächst noch abnimmt. Es kann dann aber innerhalb von 2 Stunden zu einer erneuten Durchströmung kleiner Kapillaren kommen. Dabei bilden gefäßwandverklebte Erythrozyten deutliche mechanische Hindernisse für die Wiederdurchströmung mit Erythrozyten.

Beim Zustandekommen einer UV-ausgelösten Stase zeigt sich etwa folgendes Bild: in einem Teil der Gefäße kommt es zunächst zu einer erhöhten Durchströmungsgeschwindigkeit, während sie in anderen Gefäßen konstant bleibt oder nur mäßig abnimmt. Einige Zeit vor Eintritt der eigentlichen Stase beobachtet man zunächst vereinzelt, später immer häufiger Erythrozyten, die sich nicht mehr frei im Gefäßlumen bewegen, sondern an der Gefäßwand entlang rollen. Zur gleichen Zeit sind jedoch auch noch solche Erys vorhanden, die frei, d. h. ohne Rollbewegung, im Gefäßlumen flottieren. Die „Abrollbewegungen“ der Erythrozyten an der Gefäßwand erzeugen beim Beobachter den Eindruck, als wäre ihre Membran mit der Gefäßwand verklebt. Das endgültige Zustandekommen der Kapillarstase erfolgt über eine mechanische Blockierung durch ein-

zelne, gefäßwandverklebte Erythrozyten. Diese können noch eine Zeitlang Pendelbewegungen um ihren Haftpunkt an der Gefäßwand ausführen. Ein Teilgrund für die erhebliche Streuung der Staseintrittszeiten dürfte in der zufälligen Lageverteilung der haftenden Erythrozyten begründet sein: ob sie den Querschnitt für andere Erythrozyten sperren oder nicht. Auf der Zustromseite des Hindernisses kommt es zu einer Aufstauung von Erythrozyten, wie sie *Klemensiewicz*³⁶ als „rückwärts Anschoppung“ beschreibt. Nach eingetretener Stase kommt es zur optischen Auflösung der Ery-Membranen. Bei einsetzender Wiederdurchströmung beobachtet man, wie die verbackene Ery-Säule als Ganzes in das Lumen der weiteren, abführenden Gefäße vorgeschoben wird und dort wieder in einzelne Erys zerbröckelt. Die optische Auflösung der Ery-Membran während der Stase ist also keineswegs eine mechanische, zur Hämolyse führende Zerstörung ihrer Membran, sondern die Folge einer Veränderung des Brechungsindex der zwischen den verklebten Erys befindlichen Plasma-reste. In keinem Falle wurde eine Diapedese von Erys beobachtet, aus der man auf eine Auflockerung des Endothels hätte schließen können. (Über eine mögliche Diapedese anderer geformter Blutelemente läßt sich nichts aussagen, da bei der angewandten Methode nur Erys optisch einwandfrei zu beobachten waren.)

Für die Deutung dieses Haftens an der Gefäßwand scheinen drei Möglichkeiten plausibel:

1. Von der Gefäßwand selbst wird unter der Wirkung der UV-Bestrahlung ein Substrat mit adhäsiven Eigenschaften gebildet.
2. Die Ery-Membran wird klebrig.
3. Unter der Wirkung der UV-Bestrahlung entsteht ein adhäsives Substrat im Blutplasma.

Die letztgenannte Möglichkeit erscheint als die wahrscheinlichste. *Giersberg* und *Dorn*¹⁹ beschreiben ein Visköserwerden des Blutes nach der Ganzkörper-UV-Bestrahlung von Fröschen. Die Beobachtungen über Thrombenbildung in den Schwimmhautkapillaren nach Reizung mit Krotonöl, die *Klemensiewicz*³⁶ beschreibt, sind in ihrem Verlauf den hier beschriebenen sehr ähnlich, ebenso die von *Chambers* und *Zweifach*⁷ beobachteten Stasen nach stumpfer mechanischer Reizung der Kapillaren im Rattenmesenterium. Der Gedanke an die Beteiligung von Gerinnungsprozessen liegt nahe (*Witte*⁶³).

Einfluß der Arealgröße

Geht man zunächst von der sehr allgemeinen Annahme aus, es entstehe überall im bestrahlten Gewebe ein reaktionsauslösender Stoff, so wird sich ein Fließgleichgewicht zwischen Neubildung und Abbau bzw. Abtransport einstellen. Falls das lokale Fließgleichgewicht eine Schwellenkonzentration überstiege, würde es zur Auslösung der lokalen Stasen kommen. Bestrahlt man mit gleicher Energiedichte (d. h. konstantem

Energiefluß pro Flächeneinheit), wie es in diesen Versuchen geschah, so wird nach obiger Annahme die Gesamt-Neubildung mit der Fläche des Areal, bei runden Arealen also mit dem Quadrat ihres Halbmessers wachsen. Auf einen weiteren Abbau am Entstehungsort selbst besitzt die Arealgröße keinen Einfluß bezüglich der dynamischen Gleichgewichtskonzentration, wohl aber die Energiedichte. Dagegen ist der Abtransport durch Diffusion und Ausschwemmung durch das Blut wiederum von der Arealgröße abhängig. Nur in den Randzonen gegen das unbestrahlte Gewebe besteht ein im stationären Zustand konstanter Diffusionsgradient, der mit zunehmender Arealgröße im zentralen Teil gegen Null geht.

Desgleichen wird eine Ausschwemmung über die Blutbahnen mit zunehmender Arealgröße erschwert. Falls diese Annahmen richtig wären, müßte die Stasebereitschaft mindestens mit dem Quadrat des Arealhalbmessers wachsen (Neubildung), vielleicht sogar mit einer höheren Potenz (Erschwerung des Abtransportes). Diese ursprüngliche Annahme führte dazu, eine Stufung zu wählen, bei der sich die Fläche von Stufe zu Stufe jeweils etwa verdoppelte. Wenn es sich dagegen um ein im Plasma selbst gebildetes adhäsives Substrat handelt, dann ist für die entstehende Menge dieses Substrates neben der Intensität des eingestrahlt UV-Anteils im wirksamen Wellenlängenbereich (250—300 m μ) vor allem die Verweilzeit im bestrahlten Areal maßgeblich. Für eine annähernd laminare Strömung, wie man sie mindestens für die Randgebiete der im allgemeinen beobachteten Kapillaren annehmen kann, herrscht in den gefäßwandnahen Schichten eine sehr kleine Strömungsgeschwindigkeit, in Sonderheit mit Rücksicht auf die relativ hohe Viskosität des Blutplasmas. Ein Rückschluß aus der Passagegeschwindigkeit der Erythrozyten auf die Geschwindigkeit randnaher Schichten erscheint nicht ohne weiteres zulässig. Man kann die Erythrozyten als grobe Strukturelemente auffassen, die sich, einem Kolben vergleichbar, in der Mitte der Strombahn bewegen und dort eine über ihren eigenen Querschnitt quasi-konstante (gradientenfreie) homogene Querschnittsgeschwindigkeit erzwingen. Die Verweilzeit des Blutplasmas der wandnahen Schichten ist also erheblich viel größer als die in mittenahen Stromfäden. Die Verweilzeit ist, abgesehen von der Geschwindigkeit, in den wandnahen Schichten abhängig von der Weglänge im bestrahlten Areal. Für sehr kleine Weglängen ergeben sich trotz langsamer Strömung keine allzu langen Verweilzeiten. Mit zunehmendem Durchmesser des Bestrahlungsareals wird also zunächst auch die Weglänge im Bestrahlungsareal und damit die Verweilzeit im bestrahlten Gebiet (einigermaßen vergleichbare Geschwindigkeiten der wandnahen Schichten vorausgesetzt) zunehmen. Setzt man weiter einen Reaktionsmechanismus voraus, bei dem die Konzentrationszunahme des Reaktionsproduktes ohne Rückwirkung auf die Reaktionsgeschwindigkeit bleibt — sei es nun, daß es sich um eine reversible Reaktion handelt — sei es, daß durch Ausschwemmung des Reaktionsproduktes keine zu starke Konzentration desselben auftritt — dann wird mit

zunehmender Verweilzeit (hier als lineare Funktion des Arealdurchmessers) eine immer geringere UV-Dosis pro Flächeneinheit erforderlich, bei gleichbleibendem Energiefluß also eine immer geringere Zeit bis zum Auftreten einer Stase.

Wählt man jedoch immer größere Durchmesser des bestrahlten Areals, so werden mehr und mehr Kapillaren in ihrer gesamten Längsausdehnung völlig im Inneren des bestrahlten Bereiches liegen. Dann aber wird die erforderliche Dosis pro Flächeneinheit nicht mehr vom Arealdurchmesser, sondern von der mittleren Länge des Kapillarweges abhängen. Für diesen Bereich ergäbe sich also eine Dosis, die bei starker Streuung in Abhängigkeit von der individuellen Kapillarlänge um einen allgemeinen, vom Durchmesser des Bestrahlungsareals unabhängigen, wohl aber vom UV-Energiefluß abhängigen Wert pendelt.

Der Einfluß der Arealgröße wurde in zwei Versuchsserien bestimmt, die sich bezüglich der Jahreszeit ihrer Durchführung, der eingestrahnten UV-Intensität und der Bewertungsmethode unterscheiden.

Dabei war innerhalb der Versuchsgruppen die pro Flächeneinheit eingestrahlte Energie gleich, d. h. die eingestrahlte Gesamtenergie war den Gesamtflächen der Areale proportional.

Erste Versuchsgruppe mit verändertem Arealdurchmesser

Diese Versuche wurden von August bis November 1959 durchgeführt. Jedes Tier wurde am gleichen Zwischenzehenfeld desselben Fußes mindestens je 3 Bestrahlungen mit 3 verschiedenen Arealdurchmessern ausgesetzt. Dabei wurde sorgfältig darauf geachtet, daß die einzelnen bestrahlten Areale hinreichend weit durch unbestrahlte Gebiete voneinander getrennt waren. Von diesen Bestrahlungen wurde stets eine so am Rande der Schwimnhaut durchgeführt, daß immer nur die Hälfte des Areals auf die Schwimnhaut entfiel. Dementsprechend wurden diese Bestrahlungen bei der Auswertung mit halber Fläche bzw. mit dem halben Durchmesser eingesetzt. Alle anderen Bestrahlungen erfolgten ganz im Inneren des Zwischenzehenfeldes.

Die in der Literatur ^{6, 20} angegebenen Stasezeiten streuen — trotz konstanter Arealgröße und annähernd konstanter Intensität — sehr stark. Untersuchungen über den Einfluß der Größe des Areals auf die Zeit des Staseeintrittes liegen nicht vor, jedoch die Vermutung, daß eine Mindest-Arealgröße erforderlich sei.

In dieser Versuchsgruppe wurde als Wirkungskriterium der Mittelwert der Staseeintrittszeit der ersten 5 stagnierenden Kapillaren verwandt.

Die Stufung der Lochblenden war — in der Annahme einer Abhängigkeit von der Fläche (also von der eingestrahnten Gesamtenergie) — so gewählt, daß die Fläche etwa einer geometrischen Reihe 1 : 2 : 4 : 8 : 16... entsprachen. In der Auswertung (Abb. 1) ergab sich jedoch eine Beziehung zum Durchmesser des Areals. Diese Beziehung ist für kleine Arealdurch-

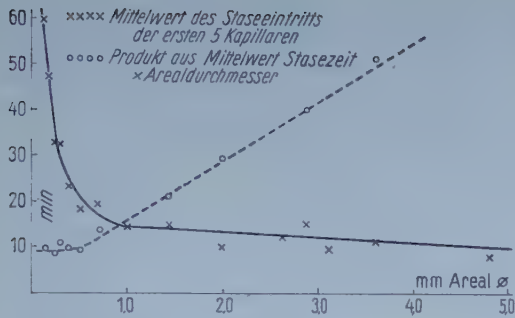


Abb. 1.

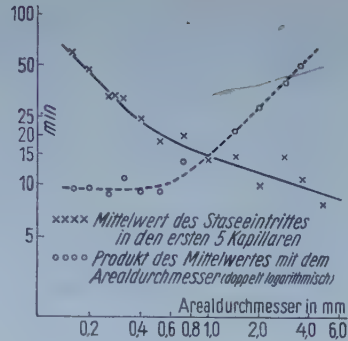


Abb. 2.

messer hyperbelähnlich, um sich für Durchmesser über 1 mm einem konstanten Werte asymptotisch anzuschmiegen.

Dieser hyperbelähnliche Verlauf legt die Vermutung einer multiplikativen Verknüpfung von Arealdurchmesser und Zeitdauer bis zum Staseeintritt nahe. In Abb. 1 ist außerdem das Produkt aus Arealdurchmesser und Mittelwert der Zeit des Staseeintrittes eingetragen. Dabei ergibt sich für kleine Lochblendendurchmesser ein praktisch konstantes Produkt, das bei zunehmendem Durchmesser in eine linear steigende Funktion des Durchmessers übergeht (d. h. konstante Stasezeit).

Die gleichen Zusammenhänge sind in einem doppelt-logarithmischen Maßstab noch einmal in Abb. 2 dargestellt, in dem konstante Produkte und konstante Quotienten als Gerade erscheinen. Die Beobachtungen zeigen eine gute Übereinstimmung mit der Hypothese über den Einfluß der Verweildauer wandnaher Schichten, die für den Fall, daß die individuelle Kapillarlänge im Mittel ganz im Inneren des Areals verläuft, sich einem konstanten, areal-unabhängigen Wert annähert.

Zweite Versuchsgruppe mit verändertem Arealdurchmesser

Von Mitte Februar bis Mitte März 1960 wurden noch einmal Versuche über die Abhängigkeit von der Arealgröße angestellt. Zur Bewertung wurden in diesem Falle die „Prozentsummen“ verwandt (Abb. 3), bzw. die aus den Prozentsummenkurven ermittelten Stasezeiten für bestimmte prozentuale Anteile der stagnierenden Kapillaren (Abb. 4).

Während in der ersten Versuchsgruppe der Mittelwert des Staseeintrittes der ersten 5 Kapillaren des ganzen Gesichtsfeldes — und somit vorwiegend nur Kapillaren der unteren Schwimnhautschicht — erfaßt wurden, erfolgte jetzt die Beurteilung aus der prozentualen Durchströmung eines zentralen Gebietes von 0,32 mm Durchmesser. Die gefundene Abhängigkeit ist generell gleich, sie zeigt für Durchmesser kleiner als 0,72 mm eine annähernd reziproke Beziehung zwischen Durchmesser und Staseeintrittszeiten, für Durchmesser größer als 1 mm eine asymptotische Annäherung an einen konstanten Wert.

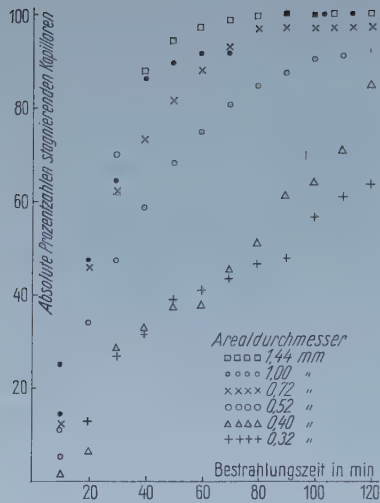


Abb. 3. (links) Staseeintritt für verschiedene Arealdurchmesser.

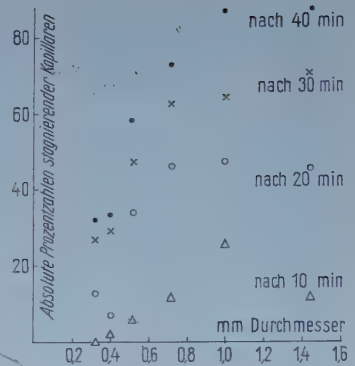


Abb. 4. (rechts) Abhängigkeit des Staseeintritts vom Durchmesser des bestrahlten Areals.

In dieser Gruppe wurde stets nur im Inneren des Zwischenzehenfeldes bestrahlt, nie am Rande der Schwimmhaut. Als erste Bestrahlung wurde stets eine mit 0,32 mm Arealdurchmesser ausgeführt, die, wie in allen Versuchen mit „Prozentsummen“-Bewertung, zugleich der Beurteilung der individuellen Streuung diene. Daran schlossen sich Bestrahlungen mit verschiedenen Arealdurchmessern, meist 4 (manchmal bis zu 8) am gleichen Fuß des gleichen Tieres an.

In dieser Gruppe wurde einige Male unter Verwendung eines Quarzkondensors kürzerer Brennweite mit einem Arealdurchmesser von 80 μ bestrahlt, dabei stieg die Energiedichte pro Flächeneinheit auf das 16fache der sonst angewandten. Hierbei blieb die Bestrahlung praktisch auf eine einzelne Kapillare beschränkt, so daß die sonst verwendeten Kriterien nicht mehr anwendbar waren. So wird auch ein zahlenmäßiger Vergleich mit anderen Arealdurchmessern unmöglich — ganz abgesehen von der wesentlichen Erhöhung des Energieflusses. Diese Versuche zeigten, daß sich auch noch in sehr kleinen Arealen bei wesentlich erhöhter Intensität Stasen in 2—3 Stunden erzwingen lassen.

In diesen Versuchen zeigte sich besonders deutlich, daß einzelne, wandverklebte Erythrozyten rein mechanisch den Durchfluß blockieren, wobei es zur „Anschoopung“ auf der Zustromseite kommt. Dabei bleibt in den Spalten zwischen den verklebten Erys zunächst noch eine Plasmaströmung bestehen, die erst durch die Anschwemmung vieler Erys auf der Zustromseite zum Erliegen kommt.

An den Abzweigstellen der Kapillaren beobachtet man oft auch ohne UV-Bestrahlung einzelne Erys, die durch den Staudruck der Strömung unter Deformation ihrer Membran an die Wand angepreßt werden und dort oft minutenlang verweilen, bis sie durch geringfügige Veränderungen der Durchströmung wieder fortgespült werden.

Bei den Bestrahlungen mit 80 μ Arealdurchmesser und 16fach größerem Energiefluß waren sie es, die zuerst verklebten und so zum Ausgangspunkt für Wandverklebungen weiterer Erythrozyten wurden.

*UV-Bestrahlungen bei gleichzeitiger Einwirkung gerinnungsbeeinflussender Pharmaka**

Die Vermutung der Beteiligung von Gerinnungsvorgängen bei der Entstehung der UV-Stasen wurde bereits angedeutet, ebenso die Parallele zu den von Klemensiewicz³⁶ an der Froschschwimmhaut und von Chambers und Zweifach⁷ am Rattenmesenterium gemachten Beobachtungen über Thrombenbildung. Dies führte zu Versuchen mit:

- a) Heparin als körpereigenem Gerinnungshemmer,
- b) Protaminsulfat als Heparinhemmer,
- c) Tween 80 einer oberflächenaktiven Substanz,
- d) Titriplex einem Ca^{++} -Ionen-Komplexbinder, und CaCl_2 -Lösungen.

Die unter Protaminsulfat gemachten Erfahrungen führten zur Prüfung der Wirksamkeit von

- e) Arginin als Hauptbestandteil des Protamins,
- f) DNS als Polysäure mit einem dem Protamin inversen Ladungsmuster.

Alle diese Versuche wurden von Dezember bis Februar mit einem Arealdurchmesser von 0,32 mm durchgeführt. Der Injektion der Pharmaka gingen 1 bis 2 Kontrollbestrahlungen voraus. Die Bewertung erfolgte durch Vergleich der „absoluten“ bzw. „normierten“ Prozentsummen. Einen Vergleich der Wirksamkeit der verschiedenen Pharmaka bietet Tab. 1.

Tabelle 1

a) „Absolute Prozentsummen“, 0,32 mm Arealdurchmesser

Pharmaka	Konzentration pro g Frosch	ohne Pharmaka	mit Pharmaka	Signifikanz der Differenz
Heparin	10 — 100 I. E.	480 \pm 19	390 \pm 17	0,001
Protamin	6 $\times 10^{-4}$ — 3 $\times 10^{-4}$	356 \pm 24	597 \pm 41	0,001
DNS	3 $\times 10^{-5}$ — 2 $\times 10^{-4}$	560 \pm 43	757 \pm 36	0,001
Arginin	3 $\times 10^{-5}$ — 2 $\times 10^{-4}$	696 \pm 35	796 \pm 37	0,05
Tween	2 $\times 10^{-6}$ — 3 $\times 10^{-5}$	558 \pm 33	732 \pm 32	0,001
Lissamin-Grün	10 ⁻⁵ — 10 ⁻⁴	644 \pm 37	547 \pm 40	—
Kongorot	10 ⁻⁵ — 5 $\times 10^{-5}$	644 \pm 37	770 \pm 71	—
Histamin	10 ⁻⁶ — 2 $\times 10^{-5}$	728 \pm 47	808 \pm 35	—
5.-HT.	5 $\times 10^{-7}$ — 5 $\times 10^{-6}$	517 \pm 49	493 \pm 42	—
Reserpin (direkt) . . .	10 ⁻⁵ — 4 $\times 10^{-5}$	739 \pm 151	752 \pm 52	—
Reserpin (vorbehandelt)	—	543 \pm 37	509 \pm 85	—

* Herrn Prof. Dr. Roka möchte ich für viele Hinweise danken.

b) „Normierte Prozentsummen“, 0,32 mm Arealdurchmesser

Pharmaka	Konzentrationen wie in Tabelle 1 a		Signifikanz der Differenz
	ohne	mit	
Heparin	100 ± 5,6	69,9 ± 4,4	0,001
Protamin	100 ± 12,1	199,0 ± 14,0	0,001
DNS	100 ± 5,5	163,4 ± 21,6	0,01
Arginin	100 ± 3,0	113,8 ± 5,6	0,05
Tween	100 ± 1,2	133,6 ± 4,0	0,001

Wirksamkeit des Heparins

Der Übertritt des Heparins aus der Lymphe ins Blut erfordert Zeit, die außerdem für Heparinpräparate verschiedener Hersteller (verwendet wurde Trombophob von Nordmark und Liquemin von La Roche) unterschiedlich ist. Bestrahlungen, die 30 Minuten nach der Injektion begannen, waren nicht gegen die vorausgehenden Kontrollen zu sichern. Andererseits klingt die Wirksamkeit in 3 bis 4 Stunden nach der Injektion wieder ab. Es wurde deshalb meist eine hohe Anfangsdosis (300 I. E. bei einem mittleren Froschgewicht von 30 g) mindestens 1 Stunde vor der nächsten Bestrahlung gegeben, und dann in Abständen von 30 Minuten kleinere Erhaltungsdosen (50—100 I. E.) nachinjiziert. Eine staseverzögernde Wirkung wurde von 5 I. E./g Frosch nachweisbar, Dosen über 30 I. E./g verstärkten die Wirkung nicht mehr, 100 I. E./g wurden noch ohne nachweisbare Schädigung vertragen. Eine Gefäßfragilität oder Spontanhämatome wurden im Schwimmbhautgebiet nicht beobachtet. Abb. 5 und Tab. 1 zeigen die deutliche, statistisch gut zu sichernde staseverzögernde Wirkung des Heparins. Eine völlige Unterdrückung der UV-Stasen war allerdings nicht zu erreichen. Dies wird verständlich, wenn man von Copleys¹⁰ Theorie ausgeht, nach der der Übergang des Fibrins in den Gel-Zustand bei Gefäßschädigungen gleichzeitig und parallel zur Aggregatbildung geformter Elemente verläuft — im Chemismus aber unabhängig, in dem bis heute keine Agenzien bekannt sind, die die Aggregatbildung hemmen oder fördern. Auch bei völliger Hemmung der Fibrin-Gel-Bildung kann es nach Copley zum Gefäßverschluß durch Agglutination geformter Elemente kommen.

Wirksamkeit von Protaminsulfat

Heparin wirkt hemmend auf die Entstehung der UV-Stasen. Erfolgt dies über die gerinnungshemmende Wirkung des Heparins, so müßte sich die Hemmung durch Protaminsulfat blockieren lassen (Literatur bei Jürgens und Beller³⁵). Spritzt man im Anschluß an Heparin-Bestrahlungen Protaminsulfat und bestrahlt nach 1 Stunde erneut (die Heparinwirksamkeit klingt sonst erst nach 3 bis 4 Stunden wieder ab), so erhält man z. B. folgende Verhältnisse:

$$\frac{\text{Heparin}}{\text{Kontrollen}} \approx 1,5$$

$$\frac{\text{Protamin}}{\text{Kontrollen}} \approx 0,8$$

$$\frac{\text{Heparin}}{\text{Protamin}} \approx 1,8$$

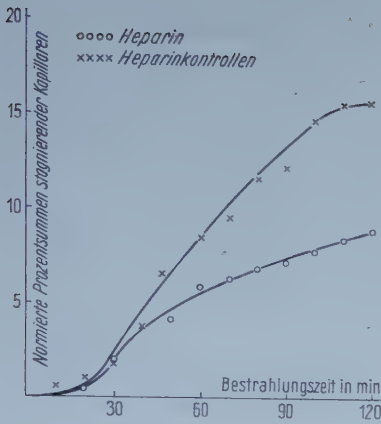


Abb. 5.

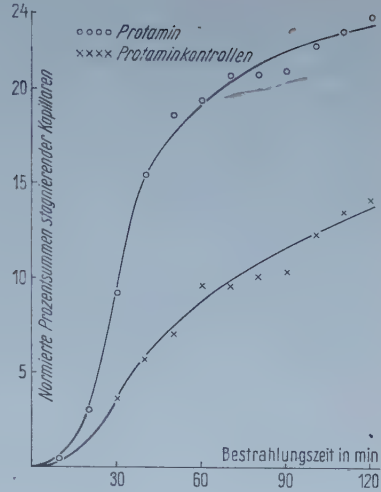


Abb. 6.

Die Protaminsulfatgabe (0,06—0,3 mg/g Frosch) blockiert also nicht nur die verzögernde Wirkung des Heparins, sondern beschleunigt darüber hinaus den Staseeintritt unter der UV-Bestrahlung.

Gibt man nach der Kontrollbestrahlung zunächst Protaminsulfat und vor der 3. Bestrahlung Heparin, so ergeben sich inverse Verhältnisse. Protaminsulfat wirkt beschleunigend auf die Ausbildung der UV-Stasen. Diese Wirkung kann durch Nachinjektion von Heparin aufgehoben werden und in eine Verzögerung umschlagen. Dieser Antagonismus spricht für den Angriffspunkt am Gerinnungssystem. Zugleich aber bedeutet dies mindestens eine Mitbeteiligung von Gerinnungsvorgängen bei der Entstehung der UV-Stasen. Die beschleunigende Wirkung des Protaminsulfates muß also auf einer Blockierung des körpereigenen Heparins beruhen. Man kann also die Hypothese aufstellen, daß unter der UV-Bestrahlung das ähnliche Histon durch Zerfall von Kernmaterial, den Hanke²³ in seinen histologischen Untersuchungen findet, freigesetzt wird und durch Blockierung des körpereigenen Heparins die UV-Stasen auslöst.

Der zeitliche Verlauf des Staseeintritts unter der Wirkung von Protaminsulfat ist in Abb. 6 wiedergegeben, die statistische Sicherung der Wirkung in Tab. 1.

Nebenwirkungen: Protaminsulfat vergrößert die Ruhigstellungsdauer, höhere Dosen (0,7 mg/g Frosch) führen zu Schädigungen der Tiere, es scheint die Wasserretention, die allgemein bei der Inaktivierung auftritt, zu mindern.

Wirksamkeit von Tween 80

Bei Gerinnungsvorgängen spielen Oberflächenbeschaffenheit und Oberflächenspannung eine bedeutsame Rolle³⁵. Unter der Annahme, daß ein

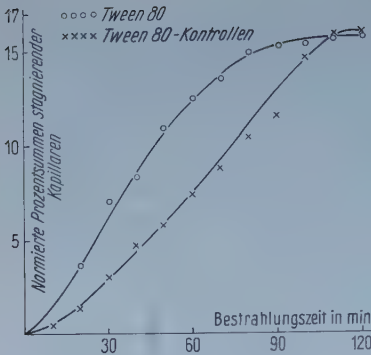


Abb. 7.

Gerinnungsprozeß Hauptursache oder doch wenigstens wesentlich mitbeteiligt bei der Entstehung von UV-Stasen ist, müßte ein Detergenz diesen Prozeß beschleunigen. Es wurde daher versucht, ob sich der Eintritt der UV-Stasen durch Änderung der Oberflächenspannung beeinflussen läßt. Als Detergenz wurde das in der Pharmakologie⁵⁹ häufig angewandte Tween 80 benutzt, ein Polyoxyaethylen-Derivat von Sorbitan-Monooleat, das nicht in Ionen aufspaltet. Injiziert wurde es mit Tyrode verdünnt in den Rückenlymphsack, daß die Konzentration bezogen auf den Frosch zwischen 2×10^{-6} bis 3×10^{-5} lag. (Mann⁴⁸ findet für Fische Detergenzienkonzentrationen von $5 \cdot 10^{-6}$ im Außenwasser tödlich — dabei dürfte es jedoch zu einer wesentlichen Anreicherung in den Grenzflächen der Kiemen kommen. Degens et al.¹¹ Sierp und Thiele⁵⁶ finden Detergenzienkonzentrationen von 1 bis $10 \cdot 10^{-6}$ im Abwasser.)

In Abb. 7 und Tab. 1 sind die Ergebnisse der Tween 80-Versuche dargestellt. Tween 80 hat eine beschleunigende Wirkung auf den Eintritt der UV-Stasen. Immerhin ist diese Wirkung schwächer als die von Protaminsulfat und DNS. Dies beruht wohl auf einer sehr auffälligen Nebenwirkung, die Tween 80 in diesen Versuchen entfaltet. Eine gleichartige Reaktion ganzer Kapillargruppen war zunächst nur nach örtlicher Applikation von Adrenalin bzw. Histamin beobachtet worden, wie in den Befunden von Giersberg und Hanke²⁰. Tween 80 erzeugte nun ebenfalls gleichartige Reaktionen aller Kapillaren. Sie wurden extrem weit gestellt und dementsprechend stark und schnell durchströmt. Diese Beobachtung ist im Einklang mit einer von Hut und Berchtold³⁰ entwickelten Hypothese, nach der die Steuerung der Kapillarweite nicht muskulöser Kapillaren („true capillaries“ im Sinne von Zweifach⁶⁷) durch Grenzflächenkräfte erfolgt, indem durch grenzflächenwirksame Stoffe ein Zusammen- oder Auseinanderrücken der das Endothel auskleidenden Phosphatidsäuregruppen bewirkt würde. Im Zusammenhang mit dieser Hypothese ist es interessant, daß Hanke²⁴ im Anschluß an UV-Bestrahlungen eine Inaktivierung alkalischer Phosphatasen findet. Der von Krantz und Bird³⁷ beobachtete Blutdruckabfall beim Hund nach i. v. Injektion von Tween läßt sich

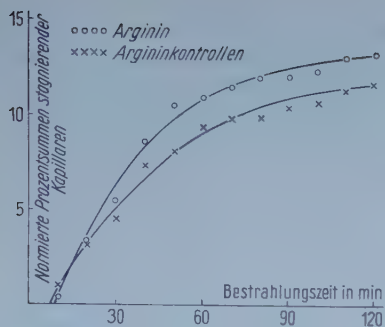


Abb. 8.

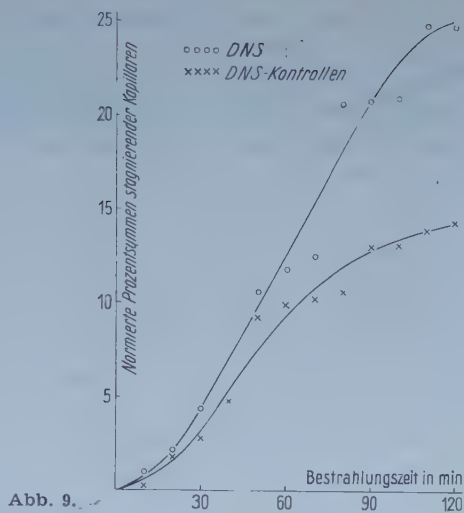


Abb. 9.

zwanglos durch Weitstellung der peripheren Gefäße deuten, ebenso die von Wieggershausen und Kupke⁶² gefundene schnellere Durchströmung der isolierten Hinterextremität der Katze. Nun treten aber in weiten, schnell durchströmten Gefäßen die UV-Stasen im allgemeinen später auf als in engen, langsam durchströmten. Wenn 80 entfaltet also hier zwei, den Eintritt von UV-Stasen entgegengesetzt beeinflussende Wirkungen, die sich zum Teil aufheben. Es erhöht die Kapillarweite und damit die Durchströmungsgeschwindigkeit und setzt so die UV-Stasebereitschaft herab. Gleichzeitig beschleunigt es die Gerinnungsvorgänge und somit die UV-Stasebereitschaft. Diese letztere Wirkung überwiegt.

Versuche mit Titriplex und CaCl_2 -Lösungen

Das Zustandekommen einer Gerinnung ist an das Vorhandensein freier Ca^{++} -Ionen gebunden. Die Verhinderung der Gerinnung *in vitro* erfolgt durch Zusatz von Citrat, Oxalat oder Titriplex (Äthylendiamintetraessigsäure). Die *in vitro* angewandten Konzentrationen werden vom Frosch nicht vertragen. Dennoch wurde versucht, mit langsam gesteigerten Titriplexmengen (0,15—1,0 mg/g Frosch) zu arbeiten. In allen Fällen trat jedoch der Herzstillstand der Tiere bei $\frac{1}{10}$ bis $\frac{1}{5}$ der *in vitro* geforderten Konzentrationen ein. Schon bei geringeren Konzentrationen war die Durchströmung der Schwimmhautkapillaren so schlecht, daß die Stasentstehung eine Folge des fehlenden zentralen Angebotes war. Die Empfindlichkeit der Tiere streute. Tiere, die in den vorausgegangenen Kontrollbestrahlungen eine hohe Stasebereitschaft zeigten, kamen erst bei höheren Titriplekonzentrationen zum Herzstillstand. So wurde erwogen, ob eine Beziehung zwischen Stasebereitschaft und Ca^{++} -Ionen-gehalt bestehe, ob eine Injektion von CaCl_2 -Lösungen die Stasebereitschaft

erhöhe. Aber auch die CaCl_2 -Injektionen (0,03—0,9 mg/g Frosch) führten zum Herzstillstand. Jeder Versuch, den Ca^{++} -Ionengehalt des intakten Tieres zu vermindern oder zu erhöhen, endete im Herzversagen. Der physiologische Calcium-Spiegel scheint — mindestens bei Winter-R. — temp. — eng limitiert zu sein, eine Regulation schneller Veränderungen nicht möglich.

Versuche mit Arginin

Protamin ist eine Polybase, die zu etwa 87% aus Arginin besteht (Langenbeck⁴³, Rauen et al.⁵⁴). Es könnte nun sein, daß die basischen Aminosäuren allein eine gleiche oder ähnliche Wirksamkeit wie Protamin zeigen. Deshalb wurden Versuche mit Arginin in etwa gleichen Konzentrationen (0,03—0,25 mg/g Frosch) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 8 und Tab. 1 dargestellt. Ein Einfluß ist statistisch nicht zu sichern, die geringfügige Beschleunigung liegt innerhalb der Streubreite. Die stasefördernde Wirksamkeit des Protamins beruht also nicht auf seiner Basizität allein, sondern vermutlich auf der speziellen Anordnung der Ladungsträger im Makromolekül.

Nebenwirkungen: Ähnlich dem Protaminsulfat wirkt es verlängernd auf die Ruhigstellungsdauer und führt in höherer Dosierung zu Allgemeinschädigungen.

Versuche mit DNS

Im Zellkernmaterial der Keimzellen ist Protamin mit DNS verkoppelt. Nachdem injiziertes Protaminsulfat eine deutlich beschleunigende Wirkung auf die Ausbildung der UV-Stasen zeigte und die Möglichkeit der Freisetzung von Histonen beim Zerfall von Zellkernen im bestrahlten Areal mit lokaler gerinnungsbeschleunigender Wirkung erwogen wurde, lag es nahe zu prüfen, ob auch der DNS (einer der Poly-Schwefelsäure Heparin wahrscheinlich im Ladungsmuster ähnlichen, makromolekularen Polyphosphorsäure) eine Wirksamkeit bei der Ausbildung von UV-Stasen zukomme. Der Einfluß der DNS (0,03—0,2 mg/g Frosch) ist in Abb. 9 und Tab. 1 dargestellt und zeigt — ähnlich dem Protaminsulfat — eine beschleunigende Wirkung auf die Ausbildung der UV-Stasen. Damit aber würden bei einem Zerfall von Kernmaterial, wie ihn Hanke²³ findet, 2 Substanzen freigesetzt, von denen DNS eine gesicherte beschleunigende Wirkung bei der Entstehung der UV-Stasen zeigt und Histone möglicherweise ähnlich dem Protamin wirken könnten und so vielleicht sogar die eigentlich auslösenden Faktoren darstellen. — Allerdings ist der histologische Nachweis von Kernpyknosen erst einige Stunden nach der UV-Bestrahlung zu erbringen.

Nebenwirkungen: DNS dürfte — im Gegensatz zum Protaminsulfat — die Ruhigstellungsdauer verkürzen (statistisch nicht gesichert). Allgemeinschädigungen wurden nicht beobachtet.

Versuche mit Vitalfarbstoffen

Wenngleich bisher die Beteiligung eines Gerinnungsprozesses gezeigt wurde, und dies für eine Abdichtung der Gefäßwände in der 1. Reaktionsphase spricht, wurde in einer weiteren Versuchsgruppe untersucht, ob die Verwendung von Vitalfarbstoffen eine Aussage über Permeationsänderungen im bestrahlten Areal gestattet.

Am geeignetsten erschien Lissamin-Grün, das nach Goldacre und Sylven²¹ noch in Konzentrationen von 1 mg/g Maus ohne Schädigung vertragen wird und die Zellmembran lebender Zellen nicht passiert, so daß seine Ausbreitung auf Blut und Lymphe — und tote Zellen — beschränkt bleibt. Die Ausscheidung erfolgt bei der Maus durch Harn und Galle innerhalb von 24 Stunden. In den Froschversuchen lag die Verträglichkeit wesentlich niedriger, etwa bei 0,1 mg/g Frosch — wobei jedoch zu bemerken ist, daß die Versuche im März während und unmittelbar nach der Laichzeit gemacht wurden. Die Ausscheidung begann — sofern kein Ruhigstellungsmittel gegeben wurde — nach etwa 2 Stunden und ließ nach 24—30 Stunden wieder nach. Zu diesem Zeitpunkt bestand auch keine deutliche Färbung der Tiere mehr. Allerdings ist auch noch nach 3 Tagen die Ausscheidung spurenweise grün gefärbt. Während des Versuches wurde — unter der Einwirkung von Succ. oder Cur., solange die Lähmung anhielt — kein Farbstoff ausgeschieden. Dies gilt analog für alle hier verwendeten Vitalfarbstoffe, soweit überhaupt eine Ausscheidung beobachtet wurde. Injiziert wurde (wie auch bei den anderen Farbstoffen) zum Teil in den dorsalen Lymphsack, von dem aus sich die Anfärbung in etwa 30 Sekunden über alle großen subkutanen Lymphräume verteilte und vor allem eine intensive Anfärbung der Vorderextremitäten und eines ventralen Streifens zwischen diesen bewirkte, dem später und schwächer eine Anfärbung der Ventralseite der Oberschenkel und des oberen Mundrandes folgte.

Brillantsulfoflavin ist ein im sichtbaren Licht schwach gelb sich lösender Fluoreszenzfarbstoff. Er wird in Konzentrationen von 0,03 mg/g Frosch noch ohne auffällige Veränderungen vertragen. Die Ausscheidung beginnt (ohne Ruhigstellung) nach 30 Minuten und ist nach 6 Stunden im wesentlichen beendet.

Bei Kongorot führen 0,05 mg/g Frosch bereits zu einer Minderung des Muskeltonus. Eine Ausscheidung unveränderten Farbstoffes ist nicht zu beobachten. Die Intensität der Färbung der Vorderextremitäten beginnt am 2. Tag nachzulassen, ist jedoch am 5. Tag noch deutlich erkennbar.

Der Tonus der Skelettmuskulatur wird bei Evansblau (0,05 mg/g Frosch) bereits so herabgesetzt, daß es zu Haltungsanomalien kommt. Ohne Ruhigstellung beginnt nach etwa 4 Stunden eine geringfügige Ausscheidung, die Haltungsanomalien schwinden, der Tonus bleibt noch immer herabgesetzt. Die spärliche Ausscheidung erstreckt sich über 7 bis 9 Tage, die Färbung ist nach 5 Tagen noch deutlich sichtbar.

Methylenblau führt bei 0,05 mg/g Frosch zum Verlust des Muskeltonus, die Atmung wird unregelmäßig bei verminderter Frequenz. Die Ausscheidung beginnt nach etwa 2 Stunden. Etwa 4 Stunden nach der Injektion sind die Frösche bei dieser Konzentration tot.

Bei allen angewandten Vitalfarbstoffen (außer Methylenblau, das wegen seiner allgemeinen Schädigung nicht für Bestrahlungsversuche verwandt wurde) war das Areal während der Bestrahlung gleichmäßig diffus gefärbt. Es kam unter der Bestrahlung weder zu einem vermehrten Einstrom noch zu einer Ausschwemmung der Farbstoffe im bestrahlten Areal. Deshalb wurden in einer weiteren Gruppe die Farbstoffe in minimaler Menge und hoher Konzentration direkt in den Lymphraum des

Zwischenzehenfeldes gebracht. Die Injektion erfolgte — wie dies *Klomensiewicz*³⁶ für Berliner Blau und Indigo-Carmin beschreibt — in die Hautfalte längs der 2. Zehe und wurde dann durch vorsichtige Massage im Zwischenzehenfeld verteilt. Jetzt hätte ein erhöhter Ausstrom aus den Kapillaren in den Lymphraum zu einer Verdünnung des Farbstoffes im Bestrahlungsareal führen müssen, eine erhöhte Resorption zu einer Anfärbung des Blutstromes. Keines von beiden wurde beobachtet. Mit Vitalfarbstoffen ließen sich also innerhalb der ersten 2 Stunden keine Anhaltspunkte für eine erhöhte Permeation durch die Kapillarwände unter der UV-Bestrahlung finden. Die von *Landis*⁴¹ angegebene elegante Methode zur Bestimmung der Kapillarpermeabilität läßt sich auf unter UV-Bestrahlung stagnierende Kapillaren nicht anwenden. (Wohl aber auf die beginnende Wiederdurchströmung, was zu einem späteren Zeitpunkt noch untersucht werden soll.)

Ein Einfluß der Vitalfarbstoffe auf die Stasebereitschaft war statistisch nicht zu sichern. Zwar ist die Stasebereitschaft beim Vergleich der „Prozentsummen“ in Tab. 1 für Lissamin-Grün vermindert, für Kongorot erhöht, doch ist die Streuung — vielleicht infolge der Laichzeit, für die viele Autoren (z. B. *Smith*^{57, 58}, *Dorn*¹³) die stärksten Streuungen angeben — so groß, daß die Differenzen nicht zu sichern waren.

*Versuche mit Histamin, 5-Hydroxy-Tryptamin und Reserpin **

In einer Anzahl älterer Arbeiten (*Lewis* und *Zottermann*⁴⁶, *Ellinger*¹⁶) wird die Freisetzung oder Entstehung von Histamin oder histaminähnlicher Substanzen (H-Substanzen) im Verlauf der UV-Reaktionen angenommen. Auf der anderen Seite bestreitet z. B. *Herzog*²⁵ wie auch *Krogh*³⁹, daß Histamininjektionen beim Frosch zu Kapillarreaktionen führen. In Übereinstimmung mit *Krogh* kamen nach endolymphaler Injektion von Histamin keine Kapillarreaktionen in der Froschschwimmhaut zur Beobachtung, wohl aber bei örtlicher Applikation, in Bestätigung der Befunde von *Giersberg* und *Hanke*²⁰. Histamin besitzt also beim Frosch eine lokale Kapillarwirksamkeit, nicht jedoch bei einer Injektion in die Lymphräume. Dennoch schien es interessant, zu prüfen, ob Histamininjektionen die Stasebereitschaft beeinflussen. *Böhmer*⁵ hat weder vor noch nach einer UV-Bestrahlung Histamin in der Froschhaut nachweisen können, wohl aber einen — im pharmakologischen Verhalten histaminähnlichen — Stoff mit Indolgrundkörper, von dem sie vermutet, daß er mit Enteramin identisch sei, und der nach UV-Bestrahlungen vermindert wird und schließlich völlig verschwindet. (Enteramin ist identisch mit Serotonin und 5-Hydroxy-Tryptamin. Im folgenden wird nach dem Vorschlag von *Bacq*¹ die letzte Bezeichnung benutzt, abgekürzt 5-HT.)

*Partington*⁵² konnte zeigen, daß ein Histaminhemmer ohne Einfluß auf die UV-Reaktionen der Haut ist. *Claesson et al.*⁸ zeigten, daß einerseits

* Ich möchte Herrn Prof. Dr. *Schümann* und Herrn Dr. *Balzer* auch an dieser Stelle noch einmal für die Hinweise zu diesem Fragenkomplex danken.

der Histaminliberator 48/80, der sowohl Histamin als auch 5-HT freisetzt, ohne Einfluß auf das UV-Oedem blieb. Dagegen konnte die Entstehung der UV-Oedeme unter Methotrimeprazine, einem 5-HT-Hemmer signifikant vermindert werden. *Johannsson*³³ beschreibt das Auftreten und die Wirksamkeit von 5-HT nach thermischen Hautverbrennungen an Ratten. Man muß also dem 5-HT mindestens eine Beziehung zu den UV-Reaktionen der Haut zuerkennen (allerdings wahrscheinlich sekundären Reaktionen, wie in der Diskussion gezeigt wird).

So wurde untersucht, ob die Injektion von 5-HT die UV-Stasebereitschaft beeinflußt. Nun unterliegt freies 5-HT einem relativ schnellen Abbau durch die Aminooxydase (*Balzer* und *Holtz*³, *Holtz et al.*²⁸) und wird andererseits in den Blutplättchen gespeichert³³, so daß die Wirkung einer Injektion fragwürdig erscheint. Reserpin setzt 5-HT aus seinen Speichern frei und führt nach einigen Tagen zu einem weitgehenden Verlust biogener Amine.

Zwar liegen die Prozentsummen nach Histamininjektionen (1–20 γ /g Frosch) höher, doch läßt sich die Differenz statistisch nicht sichern (Tab. 1).

*Erspamer*¹⁷ gibt für *R. escul.* einen Gesamtgehalt von 1,5–3,0 γ /g Frosch an. Eine Wirkung von 5-HT im physiologischen Bereich von 0,5–5,0 γ /g Frosch war ebenfalls nicht zu sichern.

Nebenwirkung: Isolierte Weibchen gaben ohne Kopula tagelang ver einzelte Eier (keine zusammenhängende Laichballen) ab. Eine teilweise Entfärbung der Haut, die *Erspamer*¹⁷ bei etwa doppelter Konzentration beobachtete, trat nicht auf.

Eine Stunde nach einer Reserpin-Injektion (10–40 γ /g Frosch) sind alle Gefäße des Gesichtsfeldes weitgestellt und schnell durchströmt. Eine Veränderung der Stasebereitschaft war statistisch nicht zu sichern, in Anbetracht der stärkeren Durchströmung aber möglicherweise doch gegenüber den Kontrollen erhöht.

Andere Tiere wurden nach einer 6–9tägigen Reserpinvorbehandlung UV-bestrahlt. Dabei konnten Kontrollbestrahlungen an den gleichen Individuen nicht durchgeführt werden. Ein Vergleich ist also nur mit Kontrollbestrahlungen an anderen Tieren im gleichen Zeitabschnitt möglich, er deutet eine Verminderung der Stasebereitschaft an (vielleicht infolge verminderten peripheren Widerstandes), ohne daß er statistisch zu sichern wäre. Auch hier wurde keine Entfärbung der Haut auffällig.

Intermittierende UV-Bestrahlungen

Bei den Versuchen über den Einfluß der Arealgröße auf den Zeitpunkt des Staseeintrittes ergab sich für kleine Durchmesser eine etwa linear-reziproke Beziehung, die für Durchmesser = 1,0 mm gegen einen konstanten Wert geht. Die Versuche mit gerinnungsbeeinflussenden Pharmaka sprachen für die Beteiligung von Gerinnungsvorgängen. Die subjektive

Beobachtung zeigt optische Veränderungen der Gefäßwand während der Bestrahlung.

So entsteht die Frage, ob es Veränderungen im UV-bestrahlten Blute oder Veränderungen der UV-bestrahlten Gefäßwand — oder beides zugleich sind, die die Entstehung der UV-Stasen auslösen.

*Jansen*³² hat bereits 1906 versucht, die Froschzunge während der UV-Bestrahlung durch Ausquetschen einigermaßen blutleer zu machen und beobachtete im Anschluß an die Bestrahlung nach Aufhebung der Kompression ebenfalls Stasen. Gegen diese Versuche kann man jedoch einwenden, daß es ihm wohl kaum möglich war, eine wirkliche Blutleere zu erzeugen und daß andererseits der mechanische Kompressionsreiz auch für sich allein zur Stase-Auslösung führen kann, wie es *Klemensiewicz*³⁶, *Chambers* und *Zweifach*⁷ und *Illig*³¹ beschreiben. Die beiden Methoden, die eine völlig übersehbare Antwort zu geben vermöchten:

- a) die UV-Bestrahlung strömenden Froschblutes in einer künstlichen Kapillare und
- b) die UV-Bestrahlung von Kapillaren während einer *Tyrodé*-Perfusion und anschließender natürlicher Durchblutung waren technisch leider nicht durchführbar.

Ein Schluß aus der Abhängigkeit vom Arealdurchmesser ist ebenfalls unmöglich, da für kleine Durchmesser mit wachsendem Durchmesser im Mittelwert sowohl die Länge der bestrahlten Kapillarwände als auch die Verweilzeit der wandnahen Plasmaschichten im bestrahlten Areal wächst.

Wenn man nun ein kleines Areal (Durchmesser 0,32 mm) bestrahlt, dann ist die Verweilzeit des Blutes im bestrahlten Areal gering, für Erys selbst im ungünstigsten Falle kleiner als 15 Sekunden. Für die wandnahen Schichten muß man jedoch mit größeren Verweilzeiten rechnen. Läßt man nun die Bestrahlung von Pausen mit hinreichender Länge unterbrechen, so kann man annehmen, daß alles von der letzten Bestrahlung erfaßte Blut das Areal verlassen hat, bevor die nächste Bestrahlung beginnt. Wäre die Staseentstehung einzig an auslösende Reaktionen im strömenden Blut gebunden, so müßte sich in dem Maße, in dem sich die Pausenzeit der Verweildauer annähert, das Auftreten der Stasen hinauszögern, und für den Fall, daß die Pausenzeiten die Verweilzeiten übertreffen, dürften überhaupt keine Stasen mehr auftreten.

Wäre andererseits die Auslösung der Stasen nur an Veränderungen der Gefäßwände gebunden, die entweder irreversibel seien — oder deren Rückbildung doch so langsam erfolgen sollte, daß den Pausen für diese Rückbildung keine große Bedeutung zukäme, so müßte die zeitliche Summierung über die einzelnen Bestrahlungsintervalle zur gleichen Wirkdauer führen, wie sie bei einer kontinuierlichen Bestrahlung beobachtet wird.

Diese beiden Annahmen sind jedoch in der dargestellten Form zu extrem. Nach der *Copleyschen* Theorie ist eine klare Trennung zwischen strömendem Plasma und ruhender Gefäßwand nicht möglich, da die wandnahen, nicht gelierten Fibrinschichten funktionell zur Gefäßwand,

im Fließgleichgewicht von Neubildung und Abbau jedoch dem strömenden Plasma zugehören. Die oft einige Stunden nach einer UV-Stase beobachtete Wiederdurchströmung von Kapillaren zeigt, daß die Auslösung der Stasen, sofern sie von der Gefäßwand ausgeht, reversibel ist. Schließlich zeigt die ebenfalls nicht selten gemachte Beobachtung, daß es innerhalb der ersten 20 Minuten nach dem Ende einer Bestrahlung noch zu vereinzelter Stasen kommen kann, daß die Auslösung mindestens nicht auf die Bestrahlung des Blutes alleine beschränkt ist. Sie zeigt aber auch, daß die auslösenden Reaktionen Zeit beanspruchen — sei es nun in Form von Diffusionszeiten aus dem Gewebe ins Blut — sei es über langsam ablaufende Sekundärreaktionen in oder an der Gefäßwand.

In einer kleinen Versuchsgruppe folgte auf eine Bestrahlungszeit von 75 Sekunden eine ebenso lange Pause. Bezogen auf die gesamte Bestrahlungszeit ergab sich eine Verminderung der Stasebereitschaft gegenüber der Kontrolle mit kontinuierlicher Bestrahlung (s. Tab. 2), die für eine Beteiligung des strömenden Blutes an der Auslösung der Stasen spricht.

In einer größeren Versuchsgruppe wurde mit Bestrahlungs- und Pausenzeiten von je 210 Sekunden gearbeitet. Hier ergab sich — bezogen auf die Zeitsumme der Bestrahlungen — eine Erhöhung der Stasebereitschaft gegenüber einer kontinuierlichen Bestrahlung, die allerdings nur schwach

Tabelle 2

Bestrahl.- Pausen- Zeit sec. Zeit	Kontrolle kontinuierl.	Intermitt. Bestrahl.	Signifikanz der Differenz
75 / 75	887,8 \pm 65,9	674,4 \pm 68,9	0,05
210 / 210	488,9 \pm 36,0	618,3 \pm 38,5	0,05

gesichert ist (Tab. 2). Dies spricht wiederum für eine Beteiligung der Gefäßwand — oder (ihr funktionell zugehöriger) wandnaher Plasmaschichten. Der Zeitbedarf der Reaktionen im strömenden Blute wie auch seine Verweilzeit im bestrahlten Areal ist also sicher kleiner als 210 Sekunden, der Zeitbedarf der Gefäßwandreaktionen größer als 75 Sekunden. Eine Deutung wird in der Diskussion gegeben.

Insgesamt bietet die Methode der intermittierenden Bestrahlung, besonders wenn man Intensität, Bestrahlungs- und Pausenzeit unabhängig voneinander variiert, die Möglichkeit, den zeitlichen Verlauf der Reaktionen zu verfolgen, wie dies für künftige Versuche beabsichtigt ist.

Sonstige Beobachtungen

Über jahreszeitliche Veränderungen und sonstige Einflüsse der verwendeten Pharmaka wird später berichtet werden.

Versuche mit *Rana esculenta*: Durch die stärkere Pigmentierung und die Warzen auf der Schwimmhaut dieser Tiere ist die Beobachtung sehr erschwert, die große optische Dichte macht eine Registrierung der Kapillardurchströmung

oft unmöglich. Der Eintritt der Stasen erfolgt später und streut stärker als bei R. temp., wie dies auch *Giersberg* und *Hanke*²⁰ fanden. In einzelnen Fällen kommt es selbst nach 120—150 Minuten Bestrahlung nur zu einer oder gar keiner Stase im bestrahlten Areal, während bei R. temp. nach 2stündiger Bestrahlung meist mehr als die Hälfte, oft sämtliche Kapillaren des bestrahlten Areals stasieren.

Versuche mit *Xenopus laevis*: Bei ihnen erfolgt der Staseeintritt in etwa dem gleichen Zeitraum wie bei Sommer-R. temp. Trotz ihrer größeren Reaktionskonstanz wurden bisher nur wenige Versuche durchgeführt, da einerseits eine ungenügende Wasserbedeckung der Tiere schnell zu ihrer Austrocknung führt, eine zu hohe Wasserbedeckung andererseits zu einer ungenügenden Sauerstoffversorgung, so daß man während der Versuchsdauer zwischen der Gefahr des Vertrocknens und jener des Erstickens balancieren muß.

Vasomotorisch bedingter Durchströmungsstillstand: Während einzelner UV-Bestrahlungen kam es zu einem plötzlichen Durchströmungsstillstand, der aber keineswegs auf das bestrahlte Areal beschränkt war, sondern meist die 4- bis 5fache Flächenausdehnung des Bestrahlungsareals hatte. Die Grenzen gegen das übrige, normal weiter durchblutete Zwischenzehenfeld verlief unregelmäßig. Dabei dürfte es sich um eine vasomotorische Reaktion handeln. Es wurde versucht, durch Ableitung der Aktionspotentiale vom Nervus ischiadicus Veränderungen im oscillographischen Bild des Signalfusses zu Beginn oder während der UV-Bestrahlung zu verfolgen.

Diese Versuche zeigten jedoch keine wirklich eindeutige Veränderung. Da andererseits — auch bei möglichst schonender Freilegung des N. ischiadicus — die Durchblutung der Schwimmhaut stark gestört war, wurde diese Fragestellung wieder aufgegeben.

Diskussion zur Entstehung der UV-Stasen

Permeabilitätshypothese

Wohl fast alle Autoren^{7, 31, 36, 40, 41, 42, 63, 67, 68}, die eine Schädigung der Kapillarwand setzten, haben die Entstehung von Stasen an der geschädigten Stelle beschrieben. Es kommt zu einer Aufstauung von Erys, Ausbildung einer Erysäule, die gegen die Zustromseite hin wächst („Anschoppung“ nach *Klemensiewicz*³⁶) und in der eine Abgrenzung der Erymembranen optisch nicht mehr möglich ist. Ebenso stimmen die Beobachtungen jener Autoren überein, die die Wiederauflösung solcher Säulen beobachteten: daß es dabei zum Abbröckeln kleiner Gruppen oder einzelner Erys mit intakten Membranen kommt, daß also die Bildung einer optisch homogenen Erysäule keineswegs auf Hämolyse beruht. *Landis*⁴¹ beschreibt nach reversiblen Urethan-Stasen eine schnelle Plasmaströmung mit nur vereinzelt Erys, wie sie auch hier im Anschluß an reversible UV-Stasen beobachtet wurde. Die Beobachtungen während des Entstehens und bei der Wiederauflösung von UV-Stasen stimmen also mit jenen nach anderen staseauslösenden Schädigungen an Kapillaren überein, d. h. die Kapillare beantwortet Schädigungen, soweit es keine groben mechanischen Zerstörungen der Wand sind, gleichartig. Alle Autoren, die gleichzeitig das Blut mit Farbstoffen anfärbten, beobachteten beim

Auftreten von Stasen eine Anfärbung des die stagnierende Kapillare umgebenden Gewebes und zogen daraus den Schluß — *Landis*⁴¹ angenommen — daß eine Permeabilitäts-erhöhung der geschädigten Gefäßwand soviel Plasma ausströmen lasse, daß die Erys ihre Trägerflüssigkeit verlieren und gleich Schiffchen in einem plötzlich versickernden Flusse auflaufen und liegen bleiben. Dabei bleibt zunächst die Frage offen, warum es zu einer optischen Auflösung der Erymembranen in der Säule kommt.

Landis^{41, 42} hat nun gezeigt, daß die Frage, ob es zu einer Filtration durch die Gefäßwand ins Gewebe oder zu einer Resorption aus dem Gewebe ins Gefäß kommt, vom Verhältnis des Kapillardruckes zum kolloid-osmotischen Druck abhängt. Bei der Entstehung von Urethan-Stasen kommt es, trotz einer oft zu beobachtenden Weitstellung des Kapillarlumens, zu einem beträchtlichen Anstieg des Kapillarinnendruckes. Dieser Druckanstieg erfolgt noch bevor sich eine Erysäule angesammelt hat und wird von *Landis* als eine Viskositätszunahme des Blutes gedeutet. Der erhöhte Innendruck bewirkt zwangsläufig eine erhöhte Filtration aus dem Gefäß ins Gewebe — also auch einen vermehrten Austritt von Farbstoffen, sofern solche ins Blut gebracht werden. Auf den Farbstoffaustritt aber stützen sich alle Theorien, die eine Permeabilitäts-erhöhung als Ursache der Stase postulieren.

Bei der Deutung seiner Befunde nach Schädigungen der Gefäßwand durch 10% Alkohol, Quecksilberchlorid-Lösungen bzw. nach vorübergehender Anoxie, bei denen er einen bis zur Hälfte verminderten Gleichgewichtsdruck zwischen Kapillare und Gewebe findet, muß man jedoch berücksichtigen, daß diese Maßnahmen nicht auf die Gefäßwand beschränkt waren, sondern stets ausgedehnte Gewebsareale mit erfaßt wurden, so daß die stillschweigende Voraussetzung einer Konstanz des kolloid-osmotischen Druckes im Gewebe geprüft werden müßte. Nun scheint im Falle der UV-Schädigung der Gedanke an eine Permeabilitäts-erhöhung besonders naheliegend: im Anschluß an UV-Bestrahlungen können Oedeme entstehen. So benutzt *Claesson et al.*⁸ z. B. den Austritt von Evans-Blau in das bestrahlte Hautareal der Ratte als Test, *Graul*²² findet durch Messung des Verlustwinkels bei Niederfrequenz eine erhöhte Permeabilität der Froschhaut nach UV-Bestrahlung, *Böhmer*⁵ findet nach UV-Bestrahlung von Fröschen eine erhöhte Beweglichkeit für Kalium-, Natrium- und Calciumionen in der Haut. Alle diese Erscheinungen treten aber frühestens 2 Stunden (*Graul*²²) nach der Bestrahlung auf — also zu einem Zeitpunkt, in dem die Staseauslösung bereits abgelaufen ist. Eine Deutung als Folgereaktionen wird weiter unten angegeben werden. In keinem Falle wurde unter der UV-Bestrahlung eine Erydiapedese beobachtet, die für eine starke Permeabilitäts-erhöhung sprechen würde. Weder Histamin, für das eine Permeabilitäts-erhöhung beim Frosch umstritten ist^{25, 39} noch 5.-HT, dessen permeabilitäts-erhöhende Wirkung als sicher gilt^{8, 18, 55, 61}, führten zu einer statistisch sicherbaren Erhöhung der UV-Stasebereitschaft. Dies wäre jedoch zu fordern, wenn die Ent-

stehung der Stasen primär durch eine erhöhte Filtration aus den Kapillaren ins Gewebe verursacht wäre.

Die Beobachtungen mit Vitalfarbstoffen ergaben keinen Hinweis auf eine erhöhte Permeation.

Gerinnungshypothese

Sowohl Herzog²⁵ als auch Landis⁴¹ betonen bei der Beschreibung ihrer Beobachtungen ein Klebrigwerden des geschädigten Endothels. Witte⁶³ beschreibt intravasale Gerinnungen nach Gefäßwandschäden. Klemensiewicz³⁶ schildert anschaulich die Bildung von Thromben in der Froschschwimmhaut nach Reizung der Kapillarwand, wie auch ihre Verzögerung (nicht aber ihre völlige Verhinderung) durch gerinnungshemmende Stoffe. Die hier mitgeteilten Versuche zwingen zu der Annahme einer Beteiligung von Gerinnungsvorgängen bei der Entstehung von UV-Stasen, ja lassen die Vermutung aussprechen, daß durch Gerinnung an der Gefäßwand haftende Erys zur „Anschoppung“ führen, und so die von Landis⁴¹ beobachtete Erhöhung des Kapillardruckes — die der eigentlichen Stase vorausgeht — erzeugt und durch Ausbreitung der Fibrin-Gel-Bildung zur optischen Auflösung der Erymembranen in der Säule führen.

Dann aber ist eine erhöhte Filtration aus den Kapillaren ins Gewebe, wie sie auf Grund des Farbstoffaustrittes erschlossen wird, nicht die Ursache der Stase, sondern eine Folge des durch Thrombenbildung ansteigenden Kapillarinnendruckes. Weiter unten wird aufgezeigt, daß es über Folgereaktionen, nämlich der Freisetzung von 5-HT, zu einer echten Erhöhung der Kapillarpermeabilität kommen kann, die dann zur Oedembildung führt.

Nun hat Copley¹⁰ eine Theorie über die Abdichtung der Gefäßwände durch einen latenten Gerinnungsvorgang entwickelt, die die hier aufgestellte Gerinnungshypothese der Staseentstehung weiter auszudeuten gestattet. Diese Copleysche Theorie sei deshalb hier kurz dargestellt: Die Abdichtung der Gefäßwände erfolge durch eine ... „dünne, poröse, nicht zelluläre ‚endo-endotheliale‘ Schicht“ ... aus ... „n i c h t im Gel-Zustand befindlichen Fibrin“ ... Die Ausbildung dieser Schicht erfolgt im dynamischen Gleichgewicht zwischen Neuanlagerung und Fibrinolyse. Eine Störung dieses Gleichgewichtes führt bei erhöhter Anlagerung zur Hämostase, bei überwiegendem Abbau zur Diapedese und Gefäßfragilität. Copley erklärt weiter aus dieser auskleidenden Schicht und ihren Veränderungen bei gefäßschädigenden Reizen: ... „eine erhöhte Adhaesivkraft der Innenfläche des Endothels ... nahe der Verletzungsstelle“ ... und weiter könne man eine ... „klebrige Substanz beobachten, an der Plättchen, Leukozyten und auch Erythrozyten haften ... eine besondere Art von Kapillarthrombose erzeugen ... der klebrige Stoff, dessen Natur unbekannt ist, könnte ein verändertes oder vermehrtes nicht gel-förmiges Fibrin sein ...“.

Neben den von Copley selbst mitgeteilten und zitierten experimentellen Befunden bietet die Literatur eine Fülle von Beobachtungen, deren

Deutung zwanglos aus seiner Theorie folgt: die schon wiederholt zitierten Beobachtungen *Klemensiewicz's* über Thrombusbildung, die Klebrigkeit des Endothels nach Schädigung^{9, 25}, die Beobachtung von Diapedesen in der Froschzunge bei Fibrinogen-verarmten Fröschen durch *Herzog*²⁵, die Beobachtung des Haftens von Tuschekörnchen am geschädigten Endothel (z. B. bei *Landis*⁴¹), die Beobachtungen von *Witte*⁶³ über intravasale Gerinnung, die klinischen Beobachtungen von *Stamm*⁶⁰.

Eine sehr überzeugende Stützung der *Copleyschen* Theorie läßt sich schließlich aus den Befunden *Drinkers*¹⁵ herleiten. Er untersucht in Verfolgung der *Kroghschen*³⁸ Vorstellung der Kapillarsteuerung durch Hypophysenextrakte die Reaktionen der Gefäße des künstlich perfundierten Froschfußes und fand bei der Anwendung der üblichen isotonischen Elektrolytlösungen als Perfusionsmedium ein starkes Anwachsen der Gefäßpermeabilität, die durch den Zusatz von Hypophysenextrakten nicht aufzuheben war, wohl aber durch den Zusatz von Pferdeserum.

Von der *Copleyschen* Theorie ausgehend, würde eine Gefäßschädigung zu einem vermehrten Aufbau dieser gefäßauskleidenden Fibrinschicht führen, wobei das Eintreten der Stase durch Wandhaftung geformter Blutelemente, mechanische Strömungsbehinderung, Übergang in den Gelzustand — verbunden mit einer optischen Dichteänderung — die zur optischen Auflösung der Erymembranen führt — Zunahme des Kapillarinnendruckes der Zustromseite durch mechanische Blockierung des Abflusses, Zunahme der Filtration ins Gewebe — aber nicht infolge der Permeabilitätserrhöhung — sondern als Folge eines erhöhten Druckgefälles über der filtrierenden Membran. Bei der Besprechung der Versuche mit veränderter Arealgröße und intermittierender Bestrahlung wurden diese Vorstellungen als Hypothesen angesetzt, ohne daß die gemachten Beobachtungen zu Korrekturen oder Einschränkungen gezwungen hätten.

Die Untersuchungen über die Stasebereitschaft unter Verwendung von Pharmaka, deren Einfluß auf Gerinnungsvorgänge bekannt war, führte zu Ergebnissen, die sich zwanglos aus dieser Theorie ergeben. Es ist bemerkenswert, daß eine statistisch sicherbare Beeinflussung der UV-Stasebereitschaft auf pharmakologischem Wege — mit einer einzigen Ausnahme: der DNS — nur durch Heparin, Protaminsulfat und einem Detergens (Tween 80) möglich war — Stoffen also, deren Angriffspunkt und -richtung am Gerinnungssystem außer Zweifel stehen (z. B. *Jürgens* und *Beller*³⁵).

Immerhin bleiben hier zunächst drei Angriffspunkte offen:

1. Warum wurde — trotz hoher Heparindosen — die Bildung der UV-Stasen nie völlig unterdrückt?
2. Protaminsulfat wirkt — in vitro — und in Abwesenheit von Heparin ebenfalls gerinnungshemmend (Protaminsulfattest nach *Beller* und *Steichele*⁴).

3. Im Anschluß an Röntgenbestrahlungen wurden Hyperheparinämien beobachtet (Literatur bei *Jürgens* und *Beller* ³⁵).

Zu 1.: *Klemensiewicz* ³⁶ weist darauf hin, daß sich durch gerinnungshemmende Mittel zwar die Thrombusbildung hinauszögern, nicht aber verhindern läßt. Er beschreibt die Beteiligung der „Sichelzellen“ an der Thrombusbildung, die beim Frosch die Blutplättchen vertreten. *Copley* ¹⁰ betont, daß beim Aufbau eines Thrombus zwei zeitlich parallele Vorgänge ablaufen, wobei bisher der Beweis für eine chemische Kopplung nicht zu erbringen ist. Der Übergang von Fibrinogen zu Fibrin und dessen Übergang in den Gel-Zustand und parallel dazu die Agglutination der Plättchen... „Man kennt kein chemisches Mittel, das in vivo eine Plättchenagglutination verhindern könnte“...

Zu 2.: In der durchgesehenen Literatur fand sich keine Beobachtung, nach der Protaminsulfat in vivo die Gerinnung hemmt, vielleicht infolge des stets vorhandenen Überschusses an körpereigenem Heparin, das eventuell regulatorisch zusätzlich freigesetzt werden kann.

Zu 3.: Ganzkörper-Röntgenbestrahlungen sind nicht ohne weiteres mit UV-Bestrahlungen kleiner Hautareale vergleichbar. Außerdem hängt das Ergebnis vom Zeitpunkt der Beobachtung ab: *Copley* ⁹ fand bei Hamstern im Anschluß an starke Röntgenbestrahlungen zunächst eine Erhöhung der Plättchenagglutination, Thromben und Embolie, einige Tage später dagegen eine verminderte Agglutinationsneigung. So sind wohl auch die Hyperheparinämien als Gegenregulationen zu deuten.

Die Frage, welche Reaktionen zur Auslösung einer erhöhten Fibrinausscheidung an den Gefäßwänden und zum Übergang in den Gel-Zustand führen, muß hier offen bleiben. Die Versuche mit intermittierender Bestrahlung, die fortgesetzt werden sollen, deuten an, daß sowohl Reaktionen im Blut als auch in der funktionellen Gefäßwand, wenn auch mit verschiedenen Zeitkonstanten, beteiligt sind. Die Versuche mit veränderter Arealgröße zeigen, daß nicht die insgesamt ins Gewebe eingestrahlte Energie entscheidet, sondern die bestrahlte Gefäßlänge und die Verweilzeit des Blutes im Bestrahlungsgebiet, wenn man die bisherigen Ergebnisse der intermittierenden Bestrahlung bei der Interpretation berücksichtigt.

Die Erhöhung der Stasebereitschaft sowohl durch Protamin, dessen Antagonismus zum Heparin bekannt ist, als auch durch DNS — für deren Angriffspunkt am Gerinnungsgeschehen in der Literatur kein Hinweis gefunden wurde — lassen die Auslösung durch Kernzerfallprodukte möglich erscheinen, zumal *Hanke* ²³ in seinen histologischen Untersuchungen Kernzerfall findet, doch sind die Kernschädigungen zeitlich erst viel später zu beobachten als das Auftreten der Stasen.

Für eine weitere Klärung wäre auch die Frage interessant, ob Substanzen, deren Schutzwirkung gegen ionisierende Strahlen bekannt ist (*Bacq* und *Herve* ²), einen Einfluß auf die Stasebereitschaft zeigen.

Bemerkungen über die Rolle des 5.-HT bei den UV-Reaktionen

Bei der Untersuchung der Folgereaktionen (Erythem und Oedembildung) nach einer UV-Bestrahlung stand seit der Arbeit von Lewis und Zottermann⁴⁶ die Freisetzung von Histamin oder histaminähnlichen Substanzen im Mittelpunkt. Der Nachweis einer Histaminbildung aus Histidin wurde von Ellinger¹⁶ pharmakologisch und von Holtz²⁷ chemisch erbracht. In der neueren Literatur dagegen tritt das Histamin in den Hintergrund, und das im pharmakologischen Test ähnlich wirkende 5.-HT gilt als Auslöser der Folgereaktion.

Rowley und Benditt⁵⁵ finden 5.-HT bei der Erzeugung des „Ratten-Pfoten-Oedems“ 200 mal wirksamer als Histamin. West⁶¹ zeigte, daß das Auftreten Protein oder Dextran induzierter Oedeme der Ratte gehemmt wird, wenn man die Tiere mit dem, das 5.-HT aus seinen Speichern freisetzenden Reserpin vorbehandelt. Böhmer⁵ wies papierchromatographisch das Fehlen von Histamin vor und nach der UV-Bestrahlung in der Froschhaut nach. Sie konnte zeigen, daß das vor der UV-Bestrahlung reichlich in der Froschhaut vorhandene 5.-HT nach einer hinreichend langen UV-Bestrahlung verschwindet. Claesson et al.⁸ zeigten, daß der Histaminlocker „48/80“, der sowohl Histamin als auch 5.-HT freisetzt, ohne Einfluß auf die Bildung eines Rückenhautoedems bei UV-bestrahlten Ratten bleibt. Dagegen reduzierte in ihren Versuchen Methotrimeprazine, ein spezifischer 5.-HT-Hemmer, die Oedembildung. Insgesamt also scheint das Auftreten der UV-Spätreaktionen an 5.-HT gebunden zu sein.

Erspamer¹⁸ weist auf den besonders hohen Gehalt der meisten Amphibienhäute an 5.-HT und seinen Derivaten hin. Er schreibt ihm als wesentlichste physiologische Bedeutung eine spezifische Wirkung auf die Nierendurchblutung zu, wobei es über eine Minderung der Glomerulumfiltration zur Diuresehemmung kommt. Erspamers Versuche¹⁷, ob 5.-HT eine steuernde Wirkung auf den Wasserhaushalt der Frösche besitzt, konnten eine solche Wirkung jedoch nicht sichern.

Nun ist bei Säugern fast das gesamte, im Blut kreisende 5.-HT an die Blutplättchen gebunden (Humphrey und Jacques²⁹) und wird beim Plättchenzerfall während der Gerinnung freigesetzt (Zucker und Borelli⁶⁶).

Das (zum Beispiel durch Reserpin) freigesetzte 5.-HT wird relativ rasch durch die Monoaminoxidase abgebaut (Holtz et al.²⁸, Balzer und Holtz³).

Damit aber ergibt sich, wenn man die hier aufgestellte Gerinnungshypothese als Entstehungsursache der UV-Stasen anerkennt, folgendes Bild: Bei den in den Kapillaren der UV-bestrahlten Haut ablaufenden (meist reversiblen) Gerinnungsprozessen wird durch Plättchenzerfall 5.-HT freigesetzt. Da zu dieser Zeit die Durchströmung des bestrahlten Hautareals eben durch diese Gerinnungsprozesse stark behindert ist, bleibt das freigesetzte 5.-HT wesentlich am Entstehungsort und erzeugt

dort Oedem und reaktive Hyperämie. Die dabei in den Gesamtkreislauf ausgeschwemmten Mengen bleiben gering und werden dort schnell — am Entstehungsort dagegen ihrer großen Menge wegen langsam — von der Monoaminoxidase abgebaut.

So bleibt die Folgereaktion üblicherweise auf das geschädigte und durch Gerinnungsstasen zunächst mangelhaft durchblutete Hautareal beschränkt.

Diese Vorstellungen decken sich mit den zeitlichen Verlauf der Permeabilitätsänderungen der Froschhaut, die *Graul*²² im Anschluß an UV-Bestrahlungen beobachtete. Dabei kommt es zunächst zu einer Abdichtung (der Gerinnungsphase entsprechend), der nach etwa 2 Stunden eine zunehmende Permeabilität folgt (Wirkungsphase des freigesetzten 5.-HT).

Auch das von *Böhmer*⁵ gefundene Verschwinden des 5.-HT nach hinreichend langer UV-Bestrahlung der Froschhaut, sowie die erhöhte Beweglichkeit von Kalium-, Natrium- und Calcium-Ionen nach Bestrahlung ganzer Frösche ist so deutbar.

Im speziellen Falle der Amphibienhaut werden diese Deutungen jedoch durch die Befunde von *Erspamer*¹⁸ über den Gehalt an 5.-HT und die große Zahl chromaffiner, 5.-HT-bildender Zellen kompliziert. Hier müssen also — wenn es zu einem völligen Verschwinden des 5.-HT's aus der bestrahlten Froschhaut kommt, wie dies ja *Böhmer* findet — auch die Speicher entleert und die Bildungsfähigkeit der chromaffinen Zellen für 5.-HT geschädigt werden.

Schließlich ist der Vergleich der hier entwickelten Hypothese mit Beobachtungen von *Johannsson*^{33, 34} interessant. *Johannsson* findet nach thermischen Hautverbrennungen bei der Ratte einen erhöhten 5.-HT-Gehalt in der Haut. Dagegen tritt in der ersten Stunde nach der Verbrennung ein starker Abfall der Plättchenanzahl und des 5.-HT-Gehaltes im Gesamtblut auf etwa ein Drittel ein. Das an Plättchen gebundene 5.-HT steigt zugleich um $\frac{2}{7}$ des Ausgangswertes an. Da nach intravenöser Injektion von 5.-HT der Blutspiegel schon nach 2 Minuten wieder abgesunken ist, vermutet *Johannsson*, daß das Speichervermögen der Plättchen im Normalzustand nicht erschöpft sei und daß sie frei auftretendes 5.-HT durch Aufnahme inaktivieren. Heparin mindert die Freisetzung von 5.-HT aus Blutplättchen nach Verbrennungen und bei anaphylaktischen Reaktionen. Bei der Wirksamkeit des Heparins gegen anaphylaktische Reaktionen muß man jedoch die merkwürdige Parallele zwischen Gerinnungsbeeinflussung und lytischer Zerstörung der Mastzellen des Mesenteriums berücksichtigen. *Höberg* und *Uvnäs*²⁶ finden bei Ratten die Notwendigkeit von Spuren von Calcium-Ionen, die Blockierung durch Calcium-Ionen-Komplexbildner, die davon unabhängige Wirkung von Detergenzien und schließlich die Wirksamkeit von Protamin bei der lytischen Zerstörung von Mastzellen.

Den Herren Professoren Dr. H. Giersberg und Dr. K. Wezler möchte ich für Rat und Unterstützung danken.

Herrn Privatdozent Dr. R. K. Zahn danke ich für viele wertvolle Diskussionen und die Überlassung einer Assistentin.

Fräulein J. Döbel danke ich für die tagelangen Kapillarbeobachtungen am Mikroskop.

Zusammenfassung

Für die Entstehung von UV-Stasen in der Froschschwimmhaut wird der Hypothese einer Permeationserhöhung eine Gerinnungshypothese gegenübergestellt. Die Ergebnisse der Versuche mit gerinnungsbeeinflussenden Pharmaka, Vitalfarbstoffen, Histamin, 5-Hydroxy-Tryptamin und Reserpin sprechen für die Gerinnung als primäre Reaktion. Die Freisetzung von 5-Hydroxy-Tryptamin wäre dann eine Folge der Gerinnung und würde seinerseits die sekundären Reaktionen auslösen.

Summary

Against the hypothesis of a permeability increase as the cause of stases in the web of frogs due to ultraviolet light is put the hypothesis of clotting. The results with drugs influencing the clotting system, vital dyes, histamine, 5-hydroxy-tryptamine and reserpine are indicating the clotting process to be the primary reaction. Therefore the liberation of 5-hydroxy-tryptamine would be the consequence of the clotting process and then itself would initiate the secondary reactions.

Résumé

On discute l'origine des stases capillaires dans la palmure de grenouille produite par irradiation u.v. L'hypothèse d'une perméation accélérée est confronté à une théorie de coagulation. Les résultats des expériences sous l'influence de différentes pharmacas et de coloration vitale montrent, que la réaction primaire est un procès de coagulation. La délibération de 5-hydroxy-tryptamine est en ce cas une conséquence de la coagulation, produisant de sa côté les reactions secondaires.

Schrifttum

- 1 Bacq, Z. M., Rapport au II^e Congrès Internat. de Biochemie, Paris 1952, pp. 59—74; zit nach 18 — 2 Bacq, Z. M. u. A. Herve, Strahlentherapie 95 (1954): 215 — 3 Balzer, H. u. P. Holtz, Arch. exper. Path. Pharmac. 227 (1956): 547 — 4 Beller, F. K. u. D. Steichele, Zschr. exper. Med. 128 (1957): 458 — 5 Böhmer, U., Zschr. vergl. Physiol. 39 (1956): 119 — 6 Bücker, H. u. W. Hanke, Zschr. Naturforsch. 12 b (1957): 629 — 7 Chambers, R. u. B. W. Zweifach, Amer. J. Anat. 75 (1944): 173 — 8 Claesson, S., G. Wettermark u. L. Juhlin, Nature (London) 183 (1959): 1451 — 9 Copley, A. L., Proc. Internat. Soc. Hemat. 4. Internat. Congr. War del Plata, Argentina, 21.—28. 9. 1952. New York 1954, zit. nach 10 — 10 ders., Ärztl. Forsch. 11 (1957): 114 — 11 Degens, P. N., H. van der Zee, Z. O. Kommer u. A. H. Kamphius, Jour. and Proc. Inst. Sew. Purif. 63 (1950), zit nach 48 — 12 Dolk, H. E. u. N. Postma, Zschr. vergl. Physiol. 5 (1927): 417 — 13 Dorn, E., Zschr. vergl. Physiol. 37 (1955): 459 — 14 Dreyer, G. u. H. Jansen, Mitt. Finsens Lichtinst. 9 (1905): 10, zit. nach 39 — 15 Drinker, C. K., J. Physiol. 63 (1927): 249 — 16 Ellinger, F., Arch. exper. Path. Pharmac. 149 (1930): 343 — 17 Erspamer, V., Acta pharmac. tox. scand. 10 (1954): 1 — 18 ders., Pharmac. Rev. 6 (1954): 425 — 19 Giersberg, H. u. E. Dorn, Naturwiss. 40 (1954): 465 — 20 Giersberg, H. u. W. Hanke, Zschr. vergl. Physiol. 37 (1955): 128 — 21 Goldacre, R. J. u. B. Sylven, Nature 184 (1959): 63 — 22 Graul, H., Strahlentherapie, 76 (1947): 472 — 23 Hanke, W., Zschr. Naturforsch. 12 b (1957): 299 —

24 *ders.*, Persönliche Mitteilung — 25 Herzog, F., Pflügers Arch. **207** (1925): 476 — 26 Högberg, B. u. B. Uvnäs, Acta physiol. scand. **48** (1960): 133 — 27 Holtz, P., Arch. exper. Path. Pharmac. **175** (1934): 97 — 28 Holtz, P., H. Balzer u. E. Westermann, Arch. exper. Path. Pharmac. **231** (1957): 361 — 29 Humphery, J. H. u. R. Jaques, J. physiol. (London) **128** (1955): 148 — 30 Hut, R. u. R. Berchtold, Arzneimittel-Forsch. **4** (1959): 372 — 31 Illig, L., Klin. Wschr. **31** (1953): 366 — 32 Jansen, H., Danish Dissertation 10 (1906); zit nach 39 — 33 Johannsson, S. A., Acta physiol. scand. **48** (1960): 126 — 34 *ders.*, Opuscula Medica **1960**, 3 — 35 Jürgens, J. u. F. K. Beller, Klinische Methoden der Blutgerinnungsanalyse. Stuttgart 1959 — 36 Klemensiewicz, R., in: Abderhalden, Handbuch der biolog. Arbeitsmeth. V. **4**, 44 (1923) — 37 Krantz u. Bird, Fed. Proc. **8** (1949): 310; zit nach 59 — 38 Krogh, A., J. Pharmacol. Exper. Therap. **29** (1926): 177 — 39 *ders.*, The Anatomy and physiology of capillaries, New York 1959 — 40 Landis, E. M., Amer. J. Physiol. **75** (1926): 548 — 41 *ders.*, ebda. **81** (1927): 124 — 42 *ders.*, ebda. **83** (1928): 528 — 43 Langenbeck, W., Lehrbuch der Organischen Chemie, Leipzig 1938 — 44 Langendorf, H., H. G. Hohmann u. R. K. Zahn, Zschr. exper. Med. **122** (1953): 178 — 45 Langendorf, H., O. Schönbach u. R. K. Zahn, Zschr. exper. Med. **126** (1955): 62 — 46 Lewis, T. H. u. Y. Zottermann, Heart **13** (1926): 203 — 47 Lindner, A., Statistische Methoden für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure, Basel 1945 — 48 Mann, H., Arch. Fischereiwiss. **6** (1955): 131 — 49 Merker, E., Zool. Jb. Abt. allg. Zool. u. Physiol. **42** (1927): 1 — 50 *ders.*, ebda. **58** (1937): 433 — 51 Müller, Hk., Zschr. Biol. im Druck — 52 Partington, M. W., Clin. Sc. **13** (1954): 425; zit nach 8 — 53 Precht, H., J. Christophersen u. H. Hensel, Temperatur und Leben, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1955 — 54 Rauen, H. M., W. Stamm u. K. Felix, Zschr. physiol. Chem. **292** (1953): 101 — 55 Rowey, D. A. u. K. P. Benditt, J. exper. Med. **103** (1956): 399 — 56 Sierp, F. u. H. Thiele, Vom Wasser **21** 1954 — 57 Smith, C. L., J. exper. Biol. **26** (1950): 412 — 58 *ders.*, ebda. **28** (1951): 141 — 59 Sollmann, T., A manual of Pharmacology, Philadelphia, London 1957 — 60 Stamm, H., Med. Klin. **52** (1957): 1970; zit nach 10 — 61 West, G. B., Internat. Arch. Allergy **10** (1957): 257; zit nach 33 — 62 Wiegershausen, B. u. D. Kupke, Acta biol. med. Germ. **1** (1958): 249 — 63 Witte, S., in: Medizinische Grundlagenforschung Bd. III, S. 521—598, Stuttgart 1960 — 64 Zahn, R. K., Zschr. exper. Med. **130** (1958): 166 — 65 Zettner, A., Zschr. Biol. **108** (1956): 210 — 66 Zucker, M. u. J. Borelly, J. Appl. Physiol. **7** (1954): 425 — 67 Zweifach, B. W., Amer. J. Anat. **60** (1937): 473 — 68 *ders.*, Anat. Res. **73** (1939): 475.

*Aus dem Zoologischen Institut (Direktor: Prof. Dr. H. Giersberg)
und dem Institut für animalische Physiologie
(Direktor: Prof. Dr. W. Wezler) der Universität Frankfurt (Main)*

Über eine Methode zur Durchströmungsregistrierung in einzelnen Kapillaren*

Von Hanskurt Müller

Mit 10 Abbildungen

Allgemeines

Hohmann, Zahn und Langendorf¹ hatten in dem gleichen Labor eine Methodik zur Zählung der Blutkörperchenpassagen in einzelnen Kapillaren entwickelt. Dabei wurde das mikroskopische Kapillarbild auf einen Schirm projiziert, der hinter einer — auf die Kapillaren einzustellenden Blende — einen Photomultiplier trug. Die Helligkeitsänderungen während der Blutkörperchenpassagen (Abkürzung: Ery-Passagen) steuerten den Strom des Photomultipliers, der, weiter verstärkt, entweder auf einem photographischen 35 mm Papierfilm registriert wurde — oder später von einem binären Ringzähler mit 2 Dekaden und angeschlossenem elektromechanischen Impulszähler ausgezählt wurde.

Diese Methode sollte weiter ausgebaut werden, wobei neben Änderungen der optischen und elektrischen Anordnung vor allem die Registrierung und ihre Auswertung vereinfacht werden sollte.

Wird bei einer photographischen Direktregistrierung ein gutes zeitliches Auflösungsvermögen gefordert und soll trotzdem über längere Zeiträume beobachtet werden, so ergeben sich folgende Nachteile:

- a) Der Verbrauch an Registrierfilm ist erheblich — selbst wenn man nur in zeitlich gleich verteilten Stichproben registriert.
- b) Verteilt man die Stichproben zeitlich gleich — und das ist das technisch einfache Verfahren — so sind solche Stichproben nicht notwendig repräsentativ. Bessere Informationen erhält man, wenn zwischen den Stichproben gleichen Zeitabstandes immer dann automatisch zusätzliche Stichproben aufgerufen werden, wenn sich ein als charakteristisch erkannter Meßwert zeitlich schnell verändert ($|\frac{dy}{dt}| > \delta$). Anderer-

* Herrn Prof. Dr. K. Wezler zum 60. Geburtstag gewidmet.

seits erfordert dies besondere Markierungen in der photographischen Registrierung, um ihre zeitliche Einordnung zu gewährleisten.

- c) Die Behandlung photographischer Registrierpapiere sowie ihre Auswertung (Ausmessen, Tabellieren, Umrechnen) erfordert viel Zeit. Mit zunehmender Stichprobendichte erreicht man sehr bald in der Auswertung einen Zeitverbrauch, der die eigentliche Versuchsdauer überschreitet.

Aber auch die digitalen, zählenden Auswertungen haben ihre Nachteile:

- a) Sie erfassen nur die Häufigkeit — oder die Wiederholungshäufigkeit — eines Ereignisses (Ery-Passagen, Herzfrequenz), ohne über sonstige, damit verbundene Qualitäten eine Aussage zu gestatten.
- b) Sie ergeben nur Mittelwerte über den Auszählungszeitraum. Deshalb sind sie für Mittelwertbildungen über lange Zeiträume sehr geeignet. Will man dagegen „quasi“ Momentanwerte ermitteln, so muß man zu sehr kurzen Zählzeiten übergehen, was die Ablese- und Auswertearbeit sehr schnell anwachsen läßt.

In früheren eigenen Untersuchungen von Spike-Folgen (unveröffentlicht) hatten sich Analog-Rechensysteme bewährt, die eine fortlaufende Registrierung der Impulsfrequenzen, des Tastverhältnisses und der mittleren Impulsdauer gestatteten. Zur Registrierung diente ein Sechsfarbenpunktschreiber. Mit Rücksicht auf die Punktfolge des Schreibsystems mußte zwischen Analog-Rechner und Schreiber eine Mittelwertbildung vorgenommen werden, deren Zeitkonstante sich nach der Punktfolge des Schreibers richtete.

Solche Verfahren der Registrierung charakteristischer Werte bei zeitlicher Kompression bieten den Vorteil einer fortlaufenden Registrierung — wenn nötig über mehrere Tage. Diese Registrierungen sind billig, lückenlos, sofort sichtbar — und als geschlossene Kurvenzüge über einer Zeitachse, meist sofort (d. h. ohne weitere Umrechnung) deutbar.

Verglichen mit der direkten photographischen Registrierung bei hoher Geschwindigkeit führen solche Verfahren zu einem Informationsverlust, spezielle Aussagen über den zeitlichen Verlauf individueller Impulse, ihre Amplitude und ihre Zeitabstände sind nicht mehr möglich. Bedenkt man jedoch, daß eine lückenlose photographische Direktregistrierung und ihre Auswertung über lange Beobachtungszeiten kaum praktisch möglich ist, so kann man sagen: mit einem Verlust an detaillierter Information wird hier eine zusammenhängende Information über längere Zeiten von einigen (aber als spezifisch ausgewählten) Informationswerten gewonnen.

Verglichen mit der Auszählung bietet sie größere zeitliche Auflösung und „quasi“-Momentanwerte.

Auf Grund dieser und einiger technisch praktischer Erwägungen wurde die bisher in diesem Labor übliche Methode verlassen und die im folgenden dargestellte Methode entwickelt.

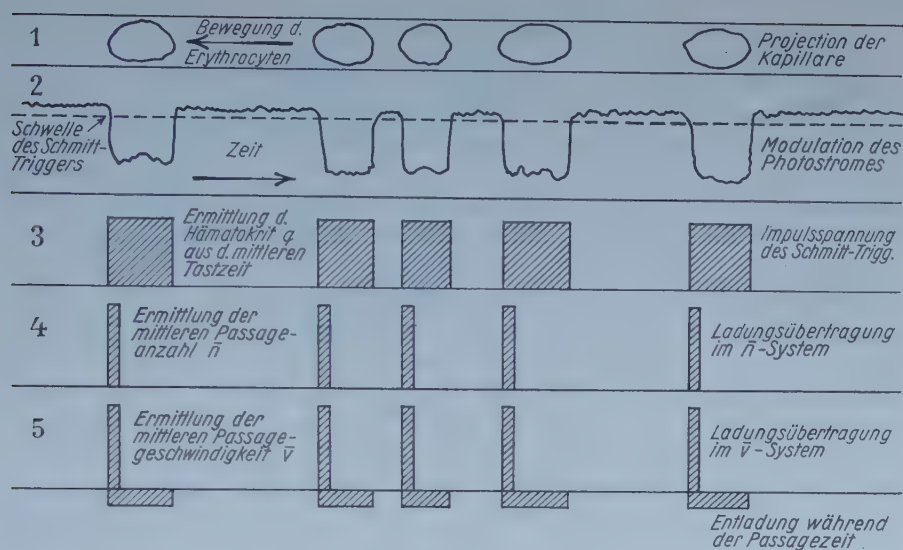


Abb. 1. Prinzip der Durchströmungsmessung.

Prinzip der Durchströmungsmessung

Das mikroskopische Bild einer geeigneten Kapillare wird auf eine Lochblende projiziert, deren Durchmesser (0,3 mm) klein ist gegenüber der Projektion des mittleren Durchmessers der Erys (etwa 1,8 mm). Der durch die Lochblende tretende Lichtfluß wird dann durch die Passagen der einzelnen Erys moduliert und moduliert seinerseits den Strom eines CdS-Photowiderstandes (Dr. B. Lange, Berlin) hinter der Lochblende. In der obersten Zeile der Abb. 1 ist schematisch die Projektion einer Kapillare mit strömenden Erys dargestellt, in der 2. Zeile die sich daraus ergebende Modulation des Photostromes. Dieser steuert nach entsprechender Verstärkung einen SCHMITT-Trigger, dessen Impulse in der 3. Zeile eingetragen wurden. Der zeitliche Mittelwert der Impulsflächen (durch elektrische Integration ermittelt) ist ein relatives Maß für den Hämatokrit. Die Vorderflanke der Trigger-Impulse löst kurze Impulse konstanter Amplitude und Dauer aus (Zeile 4 und 5).

Ihr zeitlicher Mittelwert ergibt die mittlere Anzahl der Passagen. Zur Bestimmung der relativen mittleren Passagengeschwindigkeit wird das Verhältnis der Impulsflächen der Passageanzahl (Zeile 5) zu den Impulsflächen der Passagedauer (Zeile 6) gebildet.

Aus dieser Darstellung folgt, daß die Methode nur anwendbar ist auf relativ englumige Gefäße, die praktisch „einzeln“ durchströmt sind. Da der mittlere, projizierte Erythrocyten Durchmesser sowohl in die Bestimmung des Hämatokrits als auch der Geschwindigkeit eingeht und die wandnahen Plasmaanteile nicht erfaßt werden, ergeben sich nur Relativ-Werte, deren Vergleichbarkeit auf Kapillaren etwa gleichen Querschnittes beschränkt ist.

Registrierung des EKG's

Um die peripheren Kreislaufregulationen deutlich von solchen Erscheinungen abheben zu können, deren Ursachen im zentralen Kreislauf liegen und sich dann im gesamten — also auch peripheren — Kreislauf auswirken, galt es, eine geeignete Maßgröße, die für den zentralen Kreislauf charakteristisch ist, mit zu erfassen und möglichst mit zu registrieren. Um am Frosch unter möglichst normalen physiologischen Bedingungen arbeiten zu können, schieden dafür alle „blutigen“ Methoden der Druck- oder Volumenbestimmung aus. So wurde als Charakteristikum des zentralen Kreislaufzustandes eine Brustwandableitung des EKG's gewählt. Dieses EKG wurde während der Versuchsdauer einerseits in zeitlich verteilten Stichproben direkt mitgeschrieben, andererseits über ein Analogrechen-system und Mittelwertbildung während der gesamten Versuchsdauer fortlaufend registriert, und zwar folgende Größen: Die Frequenz N und die Amplitude A (Spitzenpotential der R-Zacke). Außerdem wurden die tatsächlichen Schlagzahlen von einem Zählwerk gezählt und in bestimmten Zeitabständen abgelesen, so daß auch Mittelwerte der Frequenz für bestimmte Zeitabschnitte zur Verfügung standen.

Für spezielle Fragestellungen⁵ bestand die Möglichkeit, gleichzeitig mit der Kapillarregistrierung eine UV-Bestrahlung des registrierten Kapillargebietes durchzuführen und die optische Dichte des beobachteten Gebietes fortlaufend zu registrieren.

Optische Anordnung

Die endgültige Anordnung zeigt Abb. 2. Der Quecksilber-Hochdruck-Brenner (HQA 80 W, Osram) befand sich in einem massiven, luftgeköhlten Metallgehäuse. Das Mikroskop wurde auf ein schweres U-Profil aufgesetzt, in dem das Brennergehäuse von außen justierbar lag. Im Mikroskop (Ortholux) wurden Umlenkspiegel und Abdeckglas entfernt. In den so entstandenen Hohlraum hing ein wassergekühlter Metalltopf, der am oberen Rand auswechselbar massive Metall-Lochblenden verschiedenen Durchmessers trug. Durch diesen Aufbau wurde erreicht:

- a) daß als Lichtquelle für die Kapillarregistrierung nur noch der UV-Brenner verwendet wurde, um eine Homogenität der Registrierung der optischen Dichte zu gewährleisten. Dabei wurde der UV-Anteil des Brenners während der Nichtbestrahlungszeit durch ein Plexiglasfilter von 15 mm Schichtdicke weggefiltert. Die Durchlässigkeit von Plexiglas sinkt von 80 % bei 325 $m\mu$ auf 1 % bei 310 $m\mu$.
- b) Die Verwendung kleiner und scharf begrenzter Bestrahlungsareale durch Abbildung der Blenden, die das Bestrahlungsfeld begrenzten, mittels eines Quarzkondensors (Carl Zeiß, Jena). Dabei betrug der Abstand vom Brenner zur Lochblende 120 mm, der zwischen Lochblende und Quarzkondensor etwa 70 mm. Das Abbildungsverhältnis der Blen-

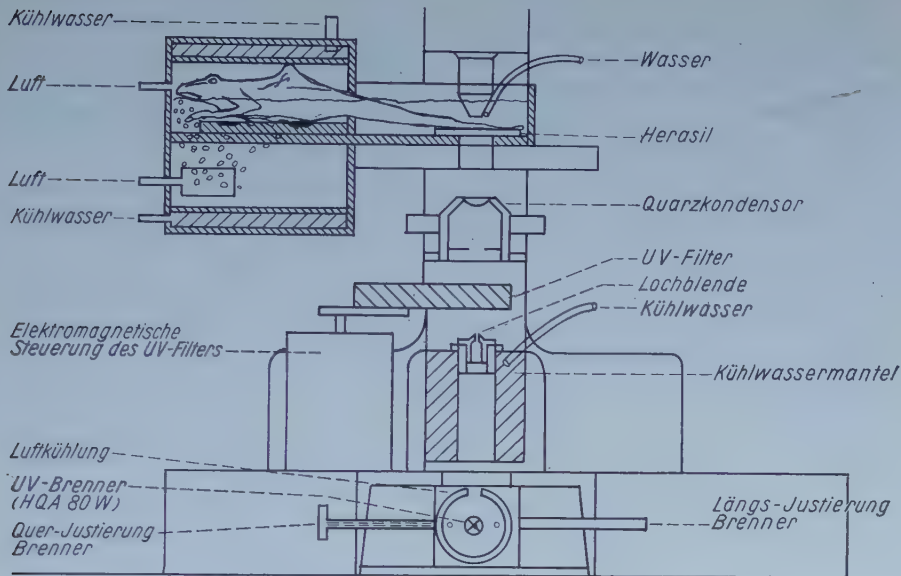


Abb. 2. Prinzip der Beleuchtung und UV-Bestrahlung.

den in der Schwimmhaut war $1:0,4$, in einigen Versuchen wurde mit einem 2-linsigen Quarzkondensor gearbeitet, mit einem Abbildungsverhältnis $1:0,1$.

- c) daß der Infrarotanteil des eingestrahltten Lichtes vermindert wurde und während der ganzen Versuchszeit (Registrierung mit und ohne UV) konstant blieb.
- d) die Möglichkeit der Intensitätsänderung des UV durch die Apperturblende des Kondensors, trotz des Betriebes des Brenners unter stabilen Entladungsbedingungen.
- e) Die Möglichkeit zeitlich partieller Bestrahlung durch Zu- und Abschalten des UV-Filters, ohne daß dadurch die Registrierung der Kapillargrößen oder der optischen Dichte gestört wurde.

Die Speisespannung des Brenners wurde dem 220 V =Netz des Institutes entnommen, in einem LC-Glied gesiebt und über Eisenwasserstoffwiderstände dem Brenner zugeführt, die Bogen Spannung des Brenners betrug 110 V , der Bogenstrom $0,66\text{ A}$, die Leistungsaufnahme also $72,6\text{ W}$. Auf diese Weise war eine konstante, mittlere Intensität des Bogens zu erzwingen. Ein leichtes Pulsieren und Wandern des Bogenendes ließ sich — trotz magnetischer Abschirmung — nicht unterdrücken.

Zwischen Lochblende und Quarzkondensor war das Plexiglasfilter auf einem Schwenkarm angeordnet und konnte durch 2 Elektromagnete zu- und abgeschaltet werden. Die Ansteuerung dieser Elektromagnete erfolgte von einer, über ein Getriebe von einem Synchronmotor angetriebenen Scheibe, die nahe dem Rand Gewindelöcher in einer 48er-Teilung trug.

Auf beiden Seiten der Scheibe waren, in verschiedenen Abständen von dieser, Kontaktfedersätze angeordnet. Je nach der Richtung und Länge der eingeschraubten Gewindestifte wurden so verschiedene Federsätze betätigt. Die Zeitintervalle wurden durch die Abstände der Gewindestifte innerhalb der 48er-Teilung gewählt.

Das Bild der zu untersuchenden Kapillare mußte in einer kontrollierbaren Weise auf die Lochblende vor dem Lichtempfänger projiziert werden.

Die Lochblende lag in der Abbildungsebene eines Photoaufsatzes und war so zentriert, daß ihre Lage mit dem Fadenkreuz seines Beobachtungsokulars korrespondierte. (Der ZEISS'sche Aufsatz erwies sich durch seine mechanisch robustere Ausführung und leichtere Zentrierbarkeit als geeigneter.)

Das dünnwandige, elastisch leicht verbiegbare Okularrohr wurde schon nach wenigen Versuchen durch ein starkwandiges Aluminiumrohr ersetzt.

Später trat die Forderung auf, das untersuchte Gefäßgebiet auch mikrophotographisch aufzunehmen. Um die Registrierung nur so kurz wie möglich unterbrechen zu müssen, wurde direkt oberhalb des Okulars ein drehbares Winkelprisma mit 4 Raststellen eingebaut.

In der 1. Stellung wird das Bild auf einer (justierbaren) Fadenkreuzplatte entworfen und durch ein Okular beobachtet. Diese Stellung dient der Durchmusterung des Gesichtsfeldes, der Auswahl einer geeigneten Kapillare und ihrer Einstellung auf das Blenden-Loch.

In der 2. Stellung wird das Bild zur Registrierung auf die Lochblende projiziert, bleibt aber über den Okularstutzen des zwischengeschalteten Photoaufsatzes der subjektiven Kontrolle zugänglich, ohne dafür die Registrierung unterbrechen zu müssen.

In der 3. Stellung kann mittels eines Photoelementes die mittlere Bildhelligkeit gemessen werden, nach der die Belichtungszeit für Mikroaufnahmen bestimmt wurde.

In der 4. Stellung entsteht das Bild in der Filmebene des Photoapparates.

Adaptierender Photozellenverstärker

Um Änderungen der mittleren Helligkeit unwirksam zu machen, wie sie infolge von optischen Dichteänderungen des Gewebes auftreten, wurde ein „adaptierender“ Verstärker verwendet. Seine Entwicklung geht auf Vorschläge von Wenking⁷ zurück.

Das Prinzip der Anordnung ist folgendes:

Man stellt über dem Arbeitswiderstand des Lichtempfängers (R_{kp}) eine „Soll“-Spannung ein (P_{soll} in Abb. 3). Der Arbeitswiderstand ist zugleich Eingangswiderstand eines Gleichspannungsverstärkers, dessen Ausgangs-

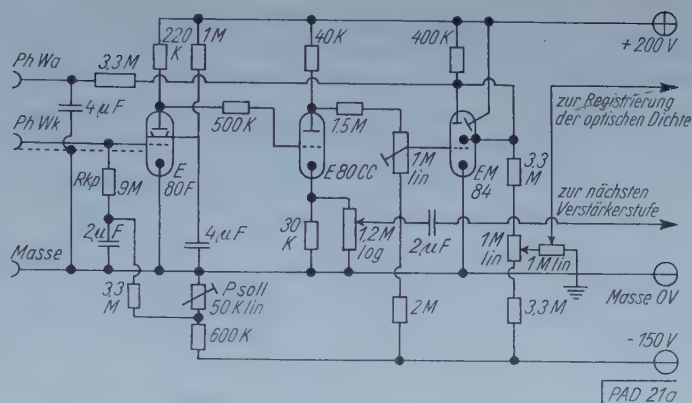


Abb. 3. Adaptierender Photozellenverstärker.

spannung mit umgekehrter Phase über ein Integrierglied großer Zeitkonstante die Saugspannung des Lichtempfängers liefert. Die ganze Anordnung ist gleichspannungsmäßig bzw. bei hinreichend langsamen Änderungen eine extreme Gegenkopplung. Ändert sich nun der Mittelwert der eingestrahlichten Lichtintensität langsam, so ändert sich gleichfalls die Saugspannung so lange, bis der Spannungsabfall über dem Arbeitswiderstand wieder der vorgegebenen „Soll“-Spannung entspricht (bis auf den Restfehler, der allen P-Reglern anhaftet und der bei hoher Verstärkung klein bleibt). Es wird also in einem gewissen Intensitätsbereich des Lichtes, dessen Grenzen durch den Aussteuerbereich des Verstärkers bedingt sind, die „Soll“-Spannung annähernd konstant gehalten. Ist nun das auffallende Licht intensitätsmoduliert (in diesem Falle durch die Ery-Passagen) mit einer Frequenz, die hoch genug ist, um vom Integrationsglied (Tiefpaß) nicht mehr durchgelassen zu werden, so erscheint im Ausgang eine Wechselspannung, deren Größe nur vom Modulationsgrad des Lichtes, nicht aber von seiner tatsächlichen Intensität abhängt (solange der Verstärker dabei nicht übersteuert wird).

Die Saugspannung über der Zelle wurde zugleich durch einen Spannungsteiler gegen -150 V auf etwa Null-Potential gezogen und ein Teil der verbleibenden Differenzspannung gegen Null zur Registrierung der optischen Dichte abgegriffen.

Durch Verwendung der Anzeige-Röhre EM 84 war die richtige Lage des Arbeitspunktes jederzeit kontrollierbar.

Ableitung und Verstärkung des EKG's

Zur Ableitung des EKG's wurde das Tier — vor dem Einschieben in das Tiergefäß — auf eine Plexiglasplatte gelegt, die 2 differente Silberdrahtelektroden und 2 Silberbleche als Masseelektroden im Abstand von je 1 cm trug. Die Placierung des Tieres erfolgte so, daß sich auf dem

Schirmbild des Oszillographen eine möglichst große EKG-Amplitude ergab. Dies war im allgemeinen dann der Fall, wenn das Sternum des Tieres zwischen den differenten Elektroden lag. Es handelt sich um eine Art Brustwandableitung — doch ist sie mit der Brustwandableitung beim Menschen insofern nicht vergleichbar, als die relative Größe der Elektroden unvergleichbar ist.

Es wurden zwei EKG-Verstärkertypen verwendet:

- a) Im Anfang ein RC-gekoppelter, 3stufiger Triodenverstärker in Gegentaktschaltung bei gleichzeitiger Gleichtaktgegenkopplung über gemeinsame Katodenwiderstände. (Das Prinzip geht auf den Gleichspannungsverstärker von König² zurück.)

Bei den gegebenen EKG-Ableitungsverhältnissen konnte an sich auf große Katodenwiderstände und damit auf ihr Tiefsetzen auf -150 V verzichtet werden. Aus Sicherheitsgründen (die EKG-Amplitude nimmt bei Kühlung unter 5°C stark ab) wurden jedoch die Katoden der I. Stufe über $80\text{ k}\Omega$ von -80 V gespeist. Dabei war die Gleichtaktverstärkung für 50 Hz 135fach, die Gegentaktverstärkung für 50 Hz 2700fach, die Gleichtaktverstärkung betrug also $1/200$ der Gegentaktverstärkung. Der Störspannungspegel bezogen auf den Eingang war bei kurzgeschlossenem Eingang $= 2\text{ }\mu\text{V}$, bei offenem (Wärmerauschen) $= 8\text{ }\mu\text{V}$. Sein Ausgang arbeitete auf einen Regelverstärker.

- b) Später wurde ein — nach gleichem Prinzip gebauter — Regelverstärker eingesetzt. Er unterscheidet sich von dem soeben beschriebenen Verstärker durch die Verwendung von 2NF-Regelpentoden in der 2. Stufe und eine wesentlich höhere Gleichtaktgegenkopplung.

Regelverstärker

Die EKG-Amplitude ändert sich mit der Temperatur — vor allem aber bei Lageänderung des Frosches relativ zu den Elektroden. Die saubere Verarbeitung des EKG's im nachfolgenden Analogsystem ist aber nur in einem bestimmten Amplitudenbereich gewährleistet. Amplitudenzunahme führt zur Mitnahme von P und endlich auch T, d. h. Frequenzanstieg auf das Doppelte und Dreifache, Amplitudenabnahme unter die Schwelle des Schmitt-Triggers zum Ausfall. Deshalb wurde ein Regelverstärker entworfen, der im Arbeitsbereich bei Schwankungen der Eingangsamplitude zwischen $0,1$ und $0,8\text{ V}$ ($1:8$), im Ausgang nur einen Amplitudenanstieg von 6 auf 10 V ($1:1,66$) zeigt (gemessen bei 50 Hz). Seine Schaltung zeigt Abb. 4. Die Anodenwechselspannung einer NF-Regel-Pentode (EF 83) wird einerseits dem nachfolgenden Analogsystem zugeführt, andererseits über ein Potentiometer einem Triodenverstärker, dessen Gitter zugleich eine einstellbare Sperrspannung erhält. Überschreitet die Ausgangsspannung die Gitterspannung, so entstehen an der

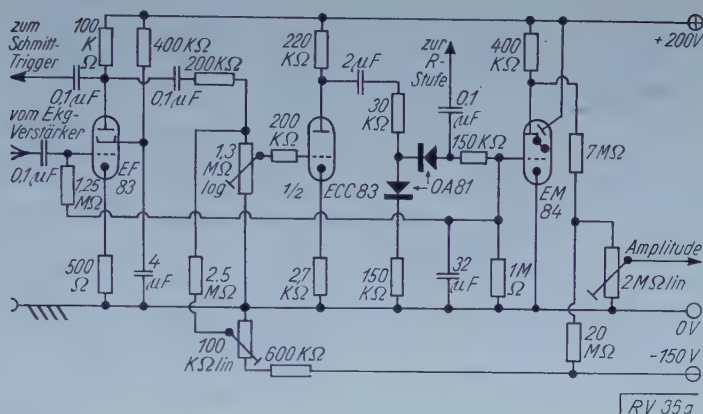


Abb. 4. Regelverstärker.

Anode Impulse, die mit wachsender Ausgangsspannung ebenfalls anwachsen. Diese steuern über einen Katodenverstärker den Spitzenspannungsgleichrichter zur Erzeugung der Regelspannung. Daneben wird mittels eines magischen Striches EM 84 die Größe der Regelspannung angezeigt und steht über ein Spannungsteilersystem zwischen U_a der EM 84 und -150 V als positive Spannung zur Amplitudenregistrierung bereit. Durch diese Unterdrückung ist die Verstärkung für $0\text{--}100\text{ mV}$ etwa 70fach, von $100\text{--}900\text{ mV}$ dagegen nur etwa 5,7fach. Die Schaltung neigt im mittleren Arbeitsbereich zu Regelschwingungen, doch bleibt die Amplitude der Regelschwingung klein genug, um nicht zu stören. Außerdem ist die Höhe der Regelspannung frequenzabhängig. Bei sehr geringen Frequenzen (Frosch bei Temperaturen unter etwa $6\text{--}7^\circ\text{ C}$) sinkt sie mit abnehmender Frequenz ab.

Beim Übergang auf den in der 2. Gegentaktstufe geregelten Vorverstärker wurde eine Erzeugung der Regelspannung beibehalten, die im wesentlichen der soeben geschilderten entsprach. Regelschwingungen konnten unterdrückt, die Frequenzabhängigkeit der Amplitudenanzeige vermindert werden. Außerdem konnte dieser Schaltung eine Spannung entnommen werden, die die Ansprechschwelle der Impulsformerstufen auf einen einstellbaren Teil (meist $4/5$) der Impulsspitzenspannung zog, d. h. also die Impulsformerstufen immer so einstellte, daß nur der höchste Impuls zum Triggern führte.

Analogrechner

Impulsformung: Die zu verarbeitenden Informationen sind der Impulsschloß und das Impulsende, dagegen ist die Impulsamplitude ohne Bedeutung. Um Impulsanfang und -ende möglichst zeitlich genau festzulegen, wurde (im Anschluß an eine Verstärkerstufe, die z. T. auch noch der Aussteueranzeige diente) eine Schmitt-Triggerschaltung verwendet. In

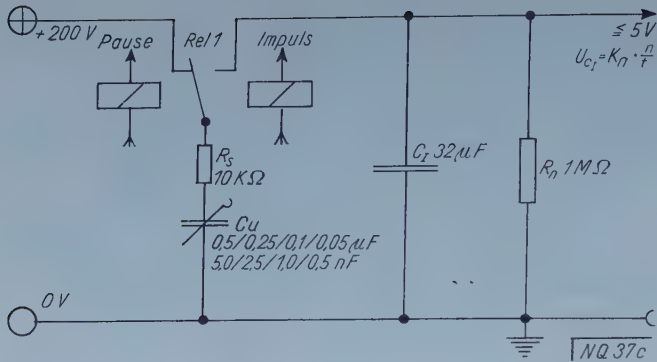


Abb. 5. Frequenzsystem.

einem früher entwickelten System für Nervenimpulse waren wegen der z. T. hohen Folgefrequenzen und kurzen Impulsdauern Elektronenröhren und Germaniumdioden als „Schalter“ verwendet worden. Bei den hier beschriebenen Versuchen aber standen längere Impulsdauern und viel geringere Folgefrequenzen zur Verfügung. Dies hätte bei Beibehaltung des ursprünglichen Systems große statische Kondensatoren mit hohen Isolationswiderständen erfordert. In diesem Bereich erschien die Verwendung schnellschaltender polarisierter Telegraphenrelais zweckmäßiger und arbeitete praktisch einwandfrei.

Frequenzsystem: Eine — vergleichsweise kleine — und zur Wahl des Frequenzbereiches umschaltbare Kapazität lädt sich in der Ruhestellung des Relais auf (Abb. 5). Beim Eintreffen eines Impulses schlägt das Relais um und der Kondensator überträgt eine bestimmte Ladungsmenge $Q = U_B \cdot C_u$ auf den Integrationskondensator C_I , und zwar um so vollständiger, je kleiner dessen Spannung, verglichen mit der Speisespannung, ist:

$$U_{cI} \ll U_B \quad (U_{cI} \leq 5 \text{ V bei } U_B = 200 \text{ V oder } 1:40) \text{ und wenn zugleich}$$

$$C_u \ll C_I \quad (C_u \leq 0,5 \mu\text{F}; C_I = 30 \mu\text{F oder } 1:64) \text{ ist.}$$

Der Integrationskondensator entlädt sich fortlaufend über R_n . Dann ist im stationären Zustand die von n Impulsen in der Zeiteinheit zugeführte Ladungsmenge:

$$\frac{n}{t} \cdot Q = \frac{n}{t} \cdot U_B \cdot C_u;$$

gleich dem durch den Widerstand R_n abfließenden Strom i_n , d. h.:

$$\frac{n}{t} \cdot Q = \frac{n}{t} \cdot U_B \cdot C_u = i_n = \frac{U_{cI}}{R_n};$$

oder umgeformt:

$$U_{cI} = \frac{n}{t} \cdot U_B \cdot C_u \cdot R_n;$$

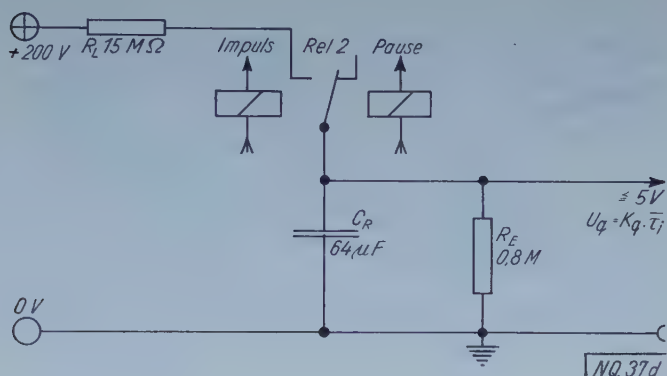


Abb. 6. Tastzeitsystem.

und da $U_B \cdot C_u \cdot R_n$ konstant sind, ist $U_{cl} \sim \frac{n}{t}$; d. h. die Spannung über dem Integrationskondensator ist also unter den obigen Einschränkungen der Impulsfrequenz proportional. Damit sich ein stationärer Zustand einstellt, muß die Zeitkonstante des Entladekreises τ_E groß sein gegen die Wiederholungsdauer $\frac{t}{n}$;

$$\tau_E = C_I \cdot R_n > \frac{t}{n} (32 \cdot 1,0 = 32 \text{ sec} > \frac{1}{10} \text{ sec Erypassagen} > 2 \text{ sec Herzschlag})$$

Zum Schutz der Relaiskontakte muß der Lade- und Entladestrom des Umladekondensators C_u begrenzt werden. Dem dient der Schutzwiderstand R_s . Die hierdurch entstehende Zeitkonstante τ_u muß klein bleiben gegen die zu erwartenden Impulsdauern.

$$\tau_u = R_s \cdot C_u < \tau_I$$

Da jedoch C_u für steigende Folgefrequenzen durch Bereichumschaltung in Stufen verkleinert wird, wird mit höherer Folgefrequenz sowohl τ_I als auch τ_u kleiner, so daß die Ungleichung $\tau_I > \tau_u$ erhalten bleibt.

Tastverhältnissystem: Zur Ermittlung des Hämatokrit q muß das Verhältnis der Passagedauer (Impulsdauer τ_i) zur Wiederholungsdauer (Impulsdauer + Pausendauer, $\tau_i + \tau_p$) gebildet werden. Das verwendete Analogsystem ist in Abb. 6 dargestellt. Unter der Voraussetzung, daß die Spannung U_q am Integrationskondensator C_q klein bleibt gegen die Speisespannung U_B

$$U_q \ll U_B \quad (U_q \leq 5 \text{ V} \ll 200 \text{ V})$$

und die Impulsdauer τ_i klein gegenüber der Ladezeitkonstante

$$\tau_L = R_L \cdot C_q \gg \tau_i; \quad (960 \text{ sec} \gg 0,3 \text{ bis } 0,03 \text{ sec})$$

wird während der Impulsdauer eine Ladungsmenge Q_L

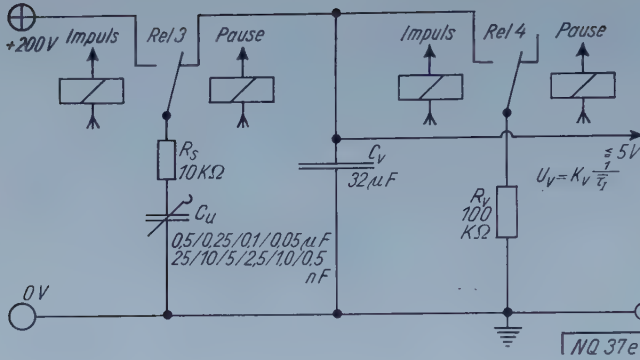


Abb. 7. Geschwindigkeitssystem.

$Q_L = \frac{U_B}{R_L} \tau_i$; auf C_q fließen. Gleichzeitig fließt von

C_q während der Wiederholungsdauer eine Ladungsmenge Q_E

$Q_E = \frac{U_q}{R_E} (\tau_i + \tau_p)$; ab. Sofern $\tau_E \gg (\tau_i + \tau_p)$;

(51 sec \gg 0,8 bis 0,05 sec) erhält man im stationären Zustand:

$$Q_L = Q_E = \frac{U_B}{R_L} \tau_i = \frac{U_q}{R_E} (\tau_i + \tau_p);$$

und nach entsprechender Umformung:

$$U_q = U_B \cdot \frac{R_E}{R_L} \cdot \frac{\tau_i}{\tau_i + \tau_p};$$

d. h. die Spannung U_q ist dem mittleren Hämatokrit q proportional.

Geschwindigkeitssystem: Nimmt man an, daß die Erythrozyten mit einem mittleren Durchmesser \bar{q} die Lochblende passieren — was bei einer hinreichend großen Beobachtungszahl gerechtfertigt ist, so ergibt sich als mittlere Passagegeschwindigkeit $\bar{V} : \bar{V} = \frac{\bar{q}}{\tau_i}$; d. h. die mittlere Geschwindigkeit \bar{V} ist der mittleren Impulsdauer τ_i umgekehrt proportional. Zu ihrer Bestimmung dient das in Abb. 7 dargestellte System. Analog zur Darstellung des frequenzmessenden Systems und den dort angegebenen Bedingungen überträgt C_u auf C_v eine Ladungsmenge Q_{vu} :

$Q_{vu} = \frac{n}{t} \cdot C_u \cdot U_B$; die den Impulszahlen pro Zeiteinheit proportional ist.

Gleichzeitig wird jeweils für die Dauer τ_i der Kondensator C_v über R_v entladen.

$Q_{vv} = \frac{U_v}{R_v} \cdot \frac{\tau_i}{\tau_i + \tau_p}$; berücksichtigt man, daß $(\tau_i + \tau_p) = \frac{t}{n}$ ist, so folgt

$$Q_{vv} = \frac{U_v}{R_v} \cdot \frac{n}{t} \cdot \tau_i;$$

Da im stationären Zustand $Q_{vu} = Q_{vv}$ sein muß, gilt:

$$Q_{vu} = \frac{n}{t} \cdot C_u \cdot U_B = \frac{U_v}{R_v} \cdot \frac{n}{t} \cdot \tau_i = Q_{vv};$$

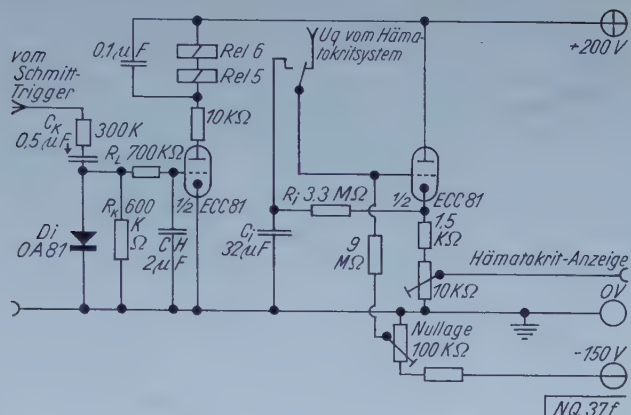


Abb. 8. Prinzip der Hämatokrithaltung.

umgeformt:

$$C_u \cdot U_B \cdot R_v \cdot \frac{1}{\tau_i} = U_v; \text{ d. h.: } U_v \sim \frac{1}{\tau_i};$$

wobei durch die Integrationseigenschaften des Systems die Mittelwertbildung von selbst erfolgt.

Hämatokrithaltung: Der Eigenart der Tastverhältnisstufe entsprechend, sinkt im Falle einer Stase die Tastverhältnisspannung U_q (entsprechend der Zeitkonstante) auf 0 ab. Biologisch aber bleibt der Hämatokrit, dessen Maß sie ist, bei Stasen meist unverändert. Bei kurzzeitigen Stasen führt das — in Verbindung mit der noch zu besprechenden Mittelwertbildung — zu Einbrüchen in der Hämatokritregistrierung. Diese Einbrüche wurden durch die in Abb. 8 dargestellte Schaltung vermieden. Der Kondensator C_H erhält, solange Impulse kommen, über Di (OA 81), C_K und R_L eine negative Spannung, die über R_L und R_K langsam abfließt. Diese dient zur Sperrung der Triode $Rö_1$. Solange also eine gewisse Mindestzahl von Impulsen pro Zeiteinheit kommt, bleibt diese Röhre gesperrt — im Falle einer Stase, die ca. 6 sec überschreitet (falls sie schon mit einer stetig verminderten Impulszahl eingeleitet wurde — schneller), fließt die Ladung über R_L und R_K ab und die Triode $Rö_1$ öffnet. In der Anodenleitung dieser Röhre liegen 2 Relais, von denen eines in der Hämatokrithaltung wirksam wird. Im stromlosen Zustand des Relais liegt das Gitter des q-Katodenfolgers $Rö_2$ im oben beschriebenen Hämatokritsystem — zur gleichen Zeit wird C_i über R_i auf das Katodenpotential aufgeladen. Im Falle einer Stase öffnet $Rö_1$ und das Relais legt das Gitter von $Rö_2$ an C_i , der sich nun dank der Mitkoppelschaltung nur sehr langsam entlädt, so daß — zusammen mit den Integrationsgliedern der Mittelwertbildung — bei nicht zu lange anhaltenden Stasen die Hämatokritregistrierung etwa auf dem zuletzt gemessenen Niveau gehalten wird. (Auf mögliche genauere Verfahren mit Motorpotentiometern wurde wegen des Aufwandes verzichtet.)

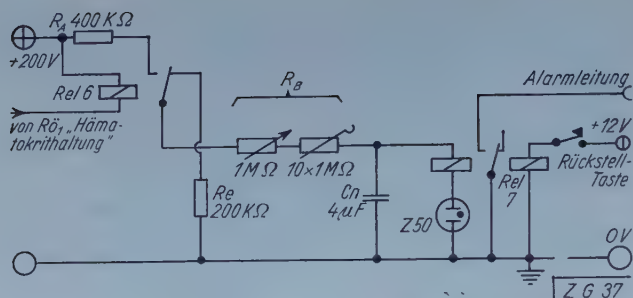


Abb. 9. Warnsystem Stase, Verzögerungsschaltung.

Warnsysteme: Bei länger dauernden Registrierungen, insbesondere wenn diese auch über Nacht fortgesetzt werden, ist es zur Entlastung des Beobachters wünschenswert, ihm Fehler in dem gesamten Versuchsaufbau und -ablauf automatisch zu signalisieren. Abgesehen von Störungen in den Geräten, die relativ selten sind, sind Veränderungen am Versuchstier die Hauptfehlerquelle.

- a) Langanhaltende Stasen im beobachteten Gefäß:
(Impulsfrequenz $n \rightarrow 0$)
- b) Durchströmung mit verklumpten Erythrozyten:
(Hämatokrit q wächst schnell: $\frac{dq}{dt} > +\epsilon$)
- c) Lageänderungen des Kapillarbildes relativ zur Lochblende:
(Hämatokrit q sinkt schnell: $\frac{dq}{dt} < -\epsilon$)
- d) Stoffwechselbedingte starke Amplitudenänderungen des EKG:
($\frac{dA}{dt} > \epsilon$)
- e) Muskelpotentiale: ($\frac{dA}{dt} > \epsilon$ und $\frac{dn}{dt} > \epsilon$)
- f) Amplitudenänderung durch relative Lageänderungen zu den Ableitelektroden: ($\left| \frac{dA}{dt} \right| > \epsilon$).

Wie man aus den in Klammern angegebenen Änderungen der Meßwerte sieht, genügen drei Kriterien:

$$\bar{n} < \epsilon_n; \quad \text{Stase}$$

$$\left| \frac{dq}{dt} \right| > \epsilon_q; \quad \text{Lage- oder Durchströmungsänderung der Kapillaren}$$

$$\left| \frac{dA}{dt} \right| > \epsilon_A; \quad \text{Stoffwechsel oder lagebedingte Amplitudenänderung des EKG oder Muskelpotentiale.}$$

Die beiden letzteren sind vom gleichen Typus, also auch von Systemen gleicher Struktur bestimmbar.

Anzeige, Registrierung, Eichung

Direktanzeige: Zur Momentankontrolle der Werte diente ein Satz von 6 Röhrenvoltmetersystemen, die untereinander gleich und auch gleich eingestellt waren. Verwendet wurden Gegentakt-Anodenbasisstufen mit 100 μ A-Metern zwischen den Katoden.

Mittelwertbildung: Mit Rücksicht auf die Punktfolge des Schreibers wurde mittels eines Tiefpasses aus 6×3 RC-Gliedern eine Mittelwertbildung vorgenommen. Die Einstellzeit auf den positiven Einheitssprung betrug für einen Restfehler $\leq 5\%$ etwa 240 Sekunden. Die Angaben beziehen sich auf den Abschluß bei angeschlossenem Schreiberverstärker mit einem scheinbaren Abschluß- (gleich Eingangs-)Widerstand von 10 MOhm.

Schreiber: Als Schreiber stand ein Sechsfarbenpunktschreiber (Hartmann und Braun) mit einem Quotientenmeßwerk zur Verfügung. Die ursprüngliche Punktfolge von 6 pro Minute wurde durch Anfertigung einer neuen Kurvenscheibe auf 12 pro Minute erhöht, so daß jeder Meßwert alle 30 Sekunden einmal geschrieben wurde. Der Anpassung zwischen dem hochohmigen Ausgang der Mittelwertbildung und dem niederohmigen Meßwerk diente eine Doppeltriode, in deren 2. System der Bezugsstrom des Kreuzspulmeßwerkes konstant gehalten wurde und das zugleich der Nullpunktkorrektur diente, während der Endausschlag mittels eines Spannungsteilers im Gitterkreis des anderen Systems eingestellt wurde.

Nullpunktunterdrückung: Es erwies sich mit der Zeit als zweckmäßiger, für den Fall einer Meßbereichsüberschreitung von 1 oder 2 Meßgrößen keine Empfindlichkeitsbereichumschaltung, sondern eine Nullpunktunterdrückung vorzunehmen. Dies Verfahren erleichtert die Auswertung. Mit Stufenschaltern konnte — für jeden einzelnen Meßkanal unabhängig — eine Unterdrückung im Verhältnis 0,2 / 0,4 / 0,6 / 0,8 / 1,0 / 1,2 / 1,4 des Skalenendwertes vorgenommen werden. Dabei wurde die Vorspannung des Gitters der Bezugsstromtriode des Schreibers entsprechend eingestellt.

Digital-Summierung: Die Anzahl der Ery-Passagen und der Herzschläge wurde mittels elektromagnetischer Impulszähler direkt ausgezählt. Nach einem anfänglichen Ablesen in bestimmten Zeitintervallen wurden später viele Zähler eingesetzt, die über Drehwähler nach eingestellten Zeitintervallen (meist $\frac{1}{2}$ h) umgeschaltet wurden. Dieses Verfahren bietet den Vorteil absolut gleichmäßiger Intervallteilung, ohne die Aufmerksamkeit des Beobachters zu beanspruchen. Je nach dem gewählten Zeitintervall brauchen die einzeln gespeicherten Werte nur nach Stunden einmal abgelesen zu werden.

Programmwerk: Das Prinzip des sehr variablen und vielseitig einsetzbaren Programmwerkes sei kurz dargestellt.

Die Gewinnung von Impulsfolgen mit kleinem Zeitabstand wurde bereits angedeutet. Von dem dort beschriebenen, durch Synchronmotor angetriebenen Kontaktsystem wird jede 5. Minute ein kurzer (2 sec) Steuerimpuls bezogen, der einen Vorwähler A erregt. Jedem der 12 Schritte dieses Vorwählers A entspricht also ein bestimmtes 5-Minuten-Intervall innerhalb einer Stunde. Bei jedem Durchlauf des Wählers A wird ein Schritt des Wählers B ausgelöst, so daß jeder Stellung des Wählers B eine bestimmte Stunde in einem 12-Stundenbereich entspricht. Endlich erregt jeder Durchlauf des Wählers B einen Schritt des Wählers C, der in 6 Tagen einmal durchläuft (Grenze der Vorwahlzeit). Alle Kontakte der Wähler-Bänke sind zu Steckvorrichtungen geführt, ebenso die Erregungsleitungen von Relaisätzen, die nach der „Und“-Schaltung verdrahtet sind (logische Multiplikation). Auf diese Weise können beliebige Zeitprogramme mit einer Auflösung von 5 Minuten in einem Vorwahlbereich von 6 Tagen gesteckt werden. Hilfsschaltungen erlauben das Nullstellen jedes einzelnen und aller Wähler von Hand, und gestatten durch Ansteuerung vom Programm selbst her auch das periodische Repetieren solcher Programme, deren Grundperiode nicht eine, 12 oder 144 Stunden dauert.

Eichung der Analog-Systeme: Die Eichung erfolgte ursprünglich mit einem selbstgebauten Impulsgenerator veränderlicher Wiederholungsfrequenz bei variablem Tastverhältnis. Da jedoch die Frequenzkonstanz bei stark unsymmetrischen Tastverhältnissen ($> 3:1$) nachließ, wurde später die Wiederholungsfrequenz einem Funktionsgenerator (*Hewlett* und *Packard*) entnommen und damit ein Impulsgenerator variabler Impulsdauer gesteuert. Dabei ist die Eichung sowohl für die Anzahl der Ery-Passagen, als auch für die Herzfrequenz eine absolute. Die Hämatokrit- und Ery-Geschwindigkeitseichung ist dagegen nur relativ. Zu einem Tastverhältnis von 1:1, das in der elektrischen Eichung einen „Hämatokrit“ von 50 % ergibt, gehört in der Kapillarmessung ein wesentlich geringerer biologischer Wert, da infolge der wandnahen Plasmaschichten und dem nicht-kolbenförmigen Durchstrom der Ery's bei einem Tastverhältnis von 1:1 wesentlich größere Plasmavolumina verschoben werden. Die Ery-Geschwindigkeitsmessung wird von der Gefäßweite beeinflusst, in engen Gefäßen, in denen die Ery-Passage tatsächlich kolbenförmig erfolgt, wird stets die größte Ery-Achse bewertet, in weitlumigen Gefäßen mit freier Flotation der Ery's aber nur eine mittlere Achsenlänge.

Tiergefäß und Temperatur

Die beschriebene Methode der Kapillarregistrierung ist auf jedes im Durchlicht mikroskopisch darstellbare Kapillargebiet anwendbar. Ihre Brauchbarkeit wurde — abgesehen von einem orientierenden Versuch an der Backentasche des syrischen Goldhamsters — an der Schwimmhaut von Fröschen getestet, auf die auch die ursprüngliche Methode angewandt worden war ^{1, 3, 4, 8}.

Die Temperatur der Tiere wurde — abgesehen von speziellen Temperaturversuchen — innerhalb des Versuches konstant gehalten. Diese für den einzelnen Versuch konstante ($\pm 0,5^{\circ}\text{C}$) Temperatur lag je nach der Jahreszeit (Gewöhnungs- oder Adaptationstemperatur⁶⁾ zwischen 14°C und 18°C . Bei der notwendigen intensiven Beleuchtung bzw. UV-Bestrahlung würde durch Absorption im Schwimmhautareal eine lokale Temperaturerhöhung auftreten. Um sie möglichst klein zu halten, wurde

- a) die sekundäre Wärmestrahlung klein gehalten, in dem das UV-Brennergehäuse, sowie die der Begrenzung des Strahlenganges dienenden Metallgehäuse fortlaufend gekühlt;
- b) das beleuchtete bzw. bestrahlte Areal möglichst klein gehalten durch Bildfeldblenden (Köhlersches Beleuchtungsprinzip);
- c) die Schwimmhaut mit Wasser konstanter Temperatur beströmt, um die durch Absorption entstehende Wärme abzuführen.
- d) Die Temperatur im beobachteten Kapillarareal war unabhängig von der Körpertemperatur zu variieren — wie auch umgekehrt.

Um eine Austrocknung der Tiere während des Versuchs (durchschnittliche Dauer etwa 22 h) zu verhindern, Temperaturkonstanz und ausreichende Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, wurde das in Abb. 2 dargestellte Tiergefäß verwendet. Der Körper des Frosches lag auf einem durchlöcherten Plexiglasboden im Innern eines doppelwandigen Rohres. Der Mantel zwischen den Rohren wurde von Wasser einstellbarer Temperatur durchströmt und diente der Einstellung einer definierten Temperatur des Versuchstieres. Das innere Rohr mit dem darin liegenden Frosch wurde soweit mit Wasser gefüllt, daß mindestens die Schwimmhäute völlig bedeckt waren. Dieses Wasser konnte mit einer — in dem Zylinderabschnitt unter dem Froschkörper — eingebauten Fritte mit Gasen gesättigt werden. Dabei wurde gleichzeitig der Frosch vom gleichen Gas umströmt. Außerdem erzeugten die entweichenden Gasblasen eine fortlaufende Durchmischung des Wassers. Der hintere Teil des Plexiglasbodens, auf den die Hinterextremitäten zu liegen kamen, wurde mit 2 Rändelschrauben am Kreuzzisch des Mikroskopes befestigt und von diesem bewegt. Kleine Stativstangen erlaubten das Anbringen verschiedener Hilfsmittel (z. B. Tuberkulinspritze, Ableitelektroden). Der den Froschkörper enthaltende „Tunnel“ wurde während des Versuchs mit einem Lappen abgedeckt, um die sensorisch weitgehend intakten Tiere gegen optische Reize abzuschirmen.

Um UV einstrahlen zu können, war der Plexiglasboden unter der Schwimmhaut durchbohrt und mit optischem Quarzglas (Herasil I) verschlossen, das mit Caedax aufgeklebt war.

Aus dem Innenraum des Tiergefäßes wurde fortlaufend Wasser durch eine Luftblasenpumpe entnommen und auf die Schwimmhaut gerichtet

zurückgeführt. Diese Pumpe hat einen doppelwandigen Mantel, der ebenfalls vom Thermostaten durchströmt wird. Die Abluft der Pumpe, die hier endgültig mit Wasserdampf aufgesättigt wird, durchströmt anschließend den Tierbehälter. (Eine Vorsättigung der Luft war notwendig.)

Die zu beobachtende Schwimmhaut muß gespreizt werden, soll dem Boden möglichst flach anliegen und sich während des Versuches möglichst wenig verschieben können, da eine Verschiebung um eine halbe Kapillarbweite (5—10 μ) die Registrierung verdirbt. Die Schwimmhaut wurde daher durch Andrücken mittels verstellbarer, schaumgummi-gepolsterter Federn aus Plexiglasstreifen fixiert. Normalerweise wurde zur Registrierung das Schwimmhautsegment zwischen der 3. und 4. Zehe des rechten Hinterbeines verwendet. Die Federn setzten jeweils am inneren Rand der 2. und 5. Zehe auf.

Den Herren Prof. Dr. H. Giersberg und Prof. Dr. K. Wezler danke ich für Rat und Unterstützung, Herrn Priv.-Doz. Dr. R. K. Zahn für wertvolle Diskussionen, Frl. J. Döbel für ihre Mitarbeit.

Zusammenfassung

Eine Methode zur fortlaufenden Registrierung der Anzahl der Erythrozyten-Passagen, ihrer Strömungsgeschwindigkeit und des Hämatokrit individueller Kapillaren bei gleichzeitiger Registrierung charakteristischer EKG-Größen wird angegeben. Die verwendeten optischen Einrichtungen, Verstärker und Analog-rechensysteme werden beschrieben.

Summary

A method for continuous recording of the number of erythrocyte-passages, their velocity and the haematocrit within individual capillaries was developed. At the same time characteristic values of the ECG are recorded. The optical systems, amplifiers and analogue systems are described in detail.

Résumé

Description d'une méthode pour l'enregistrement des nombre d'erythrocytes, de la vitesse du corpuscule et de l'hématocrite dans les vaisseaux capillaires et l'enregistrement synchrone des valeurs caractéristiques de l'ECG. Les systèmes optiques, les amplificateurs et les systèmes-analogues sont décrit.

Schrifttum

1 Hohmann, H. G., R. K. Zahn u. H. Langendorf, Zschr. exper. Med. **120** (1953): 509 — 2 König, H., Helvet. physica acta **13** (1940): 381 — 3 Langendorf, H., H. G. Hohmann u. R. K. Zahn, Zschr. exper. Med. **122** (1953): 178 — 4 Langendorf, H., O. Schönbach u. R. K. Zahn, Zschr. exper. Med. **126** (1955): 82 — 5 Müller, Hk., Zschr. Biol., im Druck — 6 Precht, H., J. Christophersen u. H. Hensel, Temperatur und Leben. Berlin 1955 — 7 Wenking, Adaptation von Photoelektronenvervielfachern. Vortrag a. d. Symposium in „System- und Informationstheorie und deren Anwendung in der Biologie“. Lorenzenhof (Oberwolfach) 3.—8. März 1959 — 8 Zahn, R. K., Zschr. exper. Med. **130** (1958): 166.

*Aus dem Physiologischen Institut der Universität München
(Direktor: Prof. Dr. R. Wagner)*

Mechanische Eigenschaften des Herzmuskels im Zustand der Kontraktur*

Von Chr. Bommert

Mit 6 Abbildungen

Eingegangen: 7. August 1961

In der Diskussion über die Möglichkeiten der Koppelung zwischen Erregung der Membran und der nachfolgenden Kontraktion der kontraktile Fibrillen stehen Befunde im Vordergrund, die im Zustand der Kontraktur, besonders an sog. lokal erregbaren Skelettmuskeln (z. B. *M. rectus* des Frosches), aber auch an anderen Muskeln erhoben worden sind (*Fleckenstein* 1955, *Hodgkin* 1960). Bei diesen Kontrakturen handelt es sich ohne Ausnahme um Dauerverkürzungen, deren primäre Ursache eine konstante Depolarisation der Membran durch Lösungen geeigneter Zusammensetzung und Konzentration ist. Alle unter solchen unphysiologischen Bedingungen gewonnenen Ergebnisse stellen uns zwangsläufig vor die Frage, ob sie für das Verständnis der normalen elektromechanischen Koppelung bei einer Einzelkontraktion irgendeine Bedeutung haben. Nach Versuchen von *Reichel* und *Bleichert* (1959) kann man auch im Ablauf einer Zuckung zeitliche Korrelationen zwischen dem an der Membran in jedem Augenblick bestehenden Potential und einer mechanischen Größe (Wiederanstieg der Spannung nach schneller Entdehnung) nachweisen.

Die vorliegenden Untersuchungen sollen an Herzpräparaten von Kaltblütern prüfen, ob sich im Zustand der Kontraktur nach Entdehnung ähnliche mechanische Effekte wie während der Einzelzuckung nachweisen lassen. Solche Effekte würden dann eine gewisse logische Verbindung zwischen den Kontrakturebefunden und den Versuchen von *Reichel* und *Bleichert* (1959) herstellen und die Beweiskraft ihrer Befunde für eine Theorie der elektromechanischen Koppelung erhöhen.

* Herrn Professor Dr. med. *H. Reichel* danke ich herzlich für die Anregung zu der Arbeit und sein Entgegenkommen bei allen auftretenden Schwierigkeiten. Herrn Privatdozent Dr. med. *A. Bleichert* danke ich für seine zahlreichen wertvollen Hinweise.

Methode

1. Präparier- und Einspannmethode der Versuchsobjekte:

Die ausreichende Diffusion in das Muskelinnere erfordert eine besondere Präpariertechnik. Als geeignete Versuchsobjekte erweisen sich Ventrikel und Vorhöfe vom Frosch (*Rana esculenta*), deren Oberfläche eine rasche Diffusion der Lösungen ermöglicht. Vom Schildkrötenherzen (*Testudo Graeca*) werden nur die dünnen Vorhöfe benützt, weil die Ventrikel Gefäße besitzen und sich deshalb für eine extravasale Diffusion nicht eignen. Aus den Herzen werden möglichst dünne und parallelfaserige Muskelstreifen herauspräpariert und vom äußeren Bindegewebe befreit, das die Bestimmung der elastischen Eigenschaften des ruhenden Muskels unmöglich macht und mit seinen Hüllen die Diffusion in das Muskelgewebe erschwert (Hill 1949, Rössel 1951). Durch möglichst vollständige Entfernung des Reizleitungssystems gelingt es, die spontane Reizbildung auszuschalten und dem Präparat eine bestimmte Schlagfolge durch künstliche Reize aufzuzwingen. Das Präparat wird möglichst breitflächig in eine Spannungsvorrichtung eingespannt, die aus feinen Silberdrähten besteht. Durch die Anordnung erreicht man ein für die Diffusion günstiges Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen. Als Nährlösung dient phosphatgepufferte O₂-gesättigte Lösung nach Barkan, Broemser und Hahn (1922), mit einem Zusatz von 100 mg% Glukose. Die Versuche werden bei Temperaturen zwischen 5 und 10° C durchgeführt. Die Temperatur wird durch einen Regler konstant gehalten, die Schwankung beträgt etwa $\pm 0,5^\circ$ C. Insgesamt sind 38 Versuche durchgeführt worden.

2. Gang der Versuche:

a) Vordehnung: Vor Beginn der Versuche wird der Muskel vorgedehnt und dabei auf ein Spannungsniveau gebracht, das die voraussichtliche Kontrakturhöhe um die Hälfte überschreitet. Der dann erfolgende allmähliche Spannungsabfall beruht auf plastischen Effekten, die nach etwa 15 Min. abgeklungen sind. In diesem plastisch verlängerten Zustand hält der Muskel die geforderte Ausgangsspannung (10—20 % der Kontrakturenspannung) in den Versuchszeiten konstant.

b) Ruheversuch: Nach der Vordehnung wird der zunächst unbeeinflusste, ruhende Muskel auf verschiedenen Spannungsniveaus schnellen Entdehnungen um etwa 1—2 % seiner Ausgangslänge nach der Methode von H. Reichel, F. Zimmer und A. Bleichert (1956) unterzogen.

c) Einzelkontraktion: Im Anschluß an die aufgenommenen Ruheversuche wird das Präparat 15 Minuten lang künstlich gereizt; in dieser Zeit stellen sich die Kontraktionen auf einen konstanten Gipfelwert ein. Der Reizabstand wird so auf die Kontraktionsdauer abgestimmt, daß zwischen 2 Reizen eine sichere Erholungsphase liegt. Die Pause beträgt das Doppelte der Kontraktionszeit. Da die Kontraktionszeit von der Temperatur abhängt, wird der Reizabstand mit steigender Temperatur verringert. Während der Kontraktionen wird der Muskel zu verschiedenen Zeitpunkten im Anstieg, im Gipfel und während der Erschlaffung entdehnt.

d) Kontraktur: In den Kontrakturversuchen wird die Nährlösung, in der sich der Muskel befindet, abgesaugt und durch die jeweilige Kontrakturenlösung ersetzt, die die gleiche Temperatur hat wie die Nährlösung. Die Lösung wird so schnell eingefüllt, daß sie möglichst schnell und gleichmäßig an das Präparat gelangt, weil sonst Einschleicheffekte auftreten und selbst bei hoher Konzentration die Wirkung gering bleibt. In den Versuchen wird das Präparat im Anstieg und im Gipfel der Kontraktur entdehnt. Nach jeder Entdehnung wird der Muskel wieder um dieselbe Länge Δl gedehnt und damit auf dieselbe Gesamtlänge wie vor der Entdehnung gebracht.

e) **Registrierung und Auswertung:** Die Spannungsänderungen bei Entdehnung in Ruhe, während der Kontraktion und Kontraktur werden durch ein *Frankisches* zentrales Kymographion registriert. Für die Ruhe- und Einzelkontraktionen beträgt die Umlaufgeschwindigkeit 2 sec, in den Kontrakturversuchen bis zu 5 min.

Zur Spannungsschreibung dienen Blattfedern verschiedener Empfindlichkeit, die bei Versuchsende durch Eichung jeweils ermittelt wird. Die auf photographischem Wege erhaltenen Kurven werden mit einer Meßplatte, die mit einem Millimeternetz versehen ist, ausgewertet.

Der Ablesefehler beträgt etwa $\pm 0,2$ mm. Je nach Bedarf wird die Spannung k_{\max} vor der Entdehnung und die Spannung gemessen, die das Präparat nach einer bestimmten Zeit im Anschluß an die Entdehnung erreicht. Die Differenz der Maximalspannung k_{\max} und der Spannung, die sich nach der Entdehnung in einem bestimmten Zeitabstand einstellt, ist $\Delta k_{\text{stat.}}$. Als $\Delta k_{\text{dyn.}}$ wird die Differenz der Maximalspannung k_{\max} und der kleinsten unmittelbar am Ende der Entdehnung registrierten Spannung bezeichnet.

d) Lösungen:

Folgende Lösungen werden verwendet (die Mol. Angaben beziehen sich auf 1000 cm³ Lösung):

Lösung A: Versuche II—VI

0,765 % KCl + 10 cm³ CaCl₂ 0,5 %
(isotonische Lösung)
das entspricht: 0,1108 Mol KCl
0,0045 Mol CaCl₂

Lösung B: Versuche VII; XXXII—XXXV

„Modifizierte BBH-Lösung“, die statt NaCl eine äquimolare Menge KCl enthält,
das entspricht: 0,1108 Mol KCl + 0,0014 Mol KCl
0,0018 Mol CaCl₂
0,0118 Mol NaHCO₃
0,0014 Mol Na₂HPO₄
0,00021 Mol NaH₂PO₄

Lösung C: Versuche VIII—XIII; XXIX—XXXI

1,53 % KCl + 1 ccm einer 2 % CaCl₂/100
(einfache hypertonische Lösung)
das entspricht: 0,2216 Mol KCl
0,0036 Mol CaCl₂

Lösung D: Versuche XVII—XXI; XXXV, XXXVI

„modifizierte BBH-Lösung“, in der statt NaCl eine äquimolare Menge CaCl₂ enthalten ist;
das entspricht: 0,1108 Mol CaCl₂
0,0018 Mol CaCl₂
0,0014 Mol KCl
0,0118 Mol NaHCO₃
0,0014 Mol Na₂HPO₄
0,0002 Mol NaH₂PO₄

Lösung E: Versuche XIV—XVI;

diese Lösung enthält 0,1108 Mol DNP (Dinitrophenol) sowie
0,0014 Mol KCl, sonst keine anderen Ionen.

Lösung F: Versuche XXIII; XXXVIII

isotonische CaCl_2 -KCl-Lösung:0,0554 Mol CaCl_2

0,0554 Mol KCl

Lösung G: Versuche XXIV—XXVI; XXXVII

isotonische KNO_3 - $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung (Ritchie 1954):0,0554 Mol KNO_3 0,0554 Mol $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$

Ergebnisse

1. Beim Einfüllen der Kontrakurlösungen treten in den meisten Versuchen initiale Zuckungen auf. In Lösungen, die statt NaCl KCl enthalten, erfolgt vor der Kontraktur stets eine Zuckung, deren Gipfelspannung über der normalen elektrisch ausgelösten Kontraktion liegt. Alle Lösungen, die einen K^+ - oder Ca^{++} -Überschuß enthalten, lösen Kontrakturen aus, ebenso Lösung E.

2. Die isometrische Kontraktur entwickelt sich relativ langsam und erreicht ihren Gipfelwert im Mittel erst nach 2—5 min (Abb. 1). Die mit CaCl_2 ausgelöste Kontraktur hat eine Anstiegszeit von etwa 18 min. Die Anstiegszeiten der Einzelkontraktionen dauern bei derselben Temperatur dagegen nur 1—2 sec.

3. Die Dauer der Kontraktur hängt von der Zusammensetzung der verwandten Lösungen ab. Alle Lösungen mit einem geringen Ca^{++} -Gehalt (A, B, C und E) rufen nur eine kurzfristige, alle Lösungen mit einem hohen Ca^{++} -Gehalt (D, F und G) eine langanhaltende Kontraktur hervor. Die Dauer der Kontraktur wird in dem untersuchten Bereich durch die Temperatur nicht beeinflusst; sie ist auch unabhängig von der Kontrakturenhöhe.

4. Die maximale Kontrakturenspannung ist gewöhnlich größer als die Gipfelspannung der Einzelkontraktion (Abb. 2 a). Das Verhältnis Kontrakturenspannung/Kontraktionsspannung ist jedoch sehr variabel; maximale Werte sind 3,4, minimale 0,6. Eine Abhängigkeit dieses Quotienten von der Art der verwandten Lösungen ließe sich nur bei einer größeren Versuchszahl sicher beurteilen. Besonders ungeeignet ist Lösung B (KCl, normaler Ca^{++} -Gehalt), in der der Muskel in 3 von 4 Versuchen die normale Kontraktionshöhe nicht erreicht; besonders geeignet ist dagegen Lösung G (isotonische K-Ca- NO_3 -Lösung), in der der Muskel stets höhere Kontrakturenspannungen als bei der Einzelkontraktion entwickelt.

5. Entdehnt man das Herzpräparat zu verschiedenen Zeitpunkten des Kontrakturenanstiegs (s. Abb. 1), also auf verschiedenen Spannungsniveaus k_{\max} , um eine kleine Länge Δl (1 % der Ausgangslänge), so steigen die momentanen Spannungsabfälle $\Delta k_{\text{dyn.}}$ mit der Spannung an. Die Punkte liegen auf derselben Kurve wie die entsprechenden im Ruhezustand und während der Einzelkontraktion gemessenen Werte (Abb. 2 b). Diese Re-

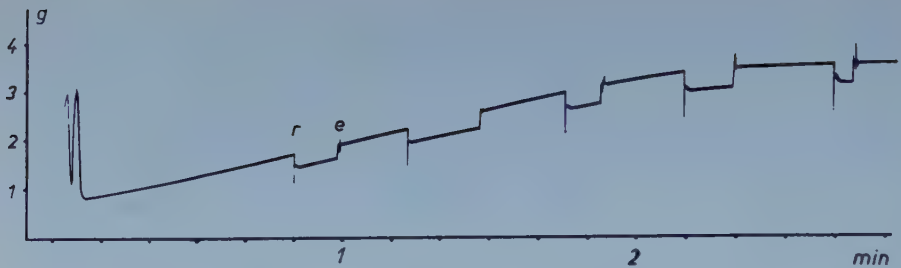


Abb. 1. Zeitlicher Verlauf der Kontrakturspannung. Zum Zeitpunkt Null wird die normale Ringerlösung durch die Kontrakturlösung ersetzt (Lösung C: 1,53 % KCl + 1 ml einer 2 % $\text{CaCl}_2/100$). Beachte Initialzuckung, r = Spannungsabfall nach schnellen Entdehnungen, e = Spannungsanstieg nach Wiederdehnungen von verschiedenen hohen Spannungsniveaus im Anstieg und Kontrakturmaximum. Längenänderung Δl 1 % der Bezugslänge l_0 ; Temperatur $6,2^\circ\text{C}$; Vorhofstreifenpräparat von *Testudo Graeca*. Ordinate: Gipfelspannung in g; Abszisse: Zeit in min.

lation trifft in allen Versuchen zu, ist also unabhängig von der verwandten Lösung.

6. Auf den momentanen Spannungsabfall Δk_{dyn} steigt die Spannung nachträglich wieder an. Der Spannungsanstieg ist größer als die elastische Nachspannung, die auch im Ruhezustand nachweisbar ist. Trägt man die Differenz $\Delta k'$ zwischen beiden Größen als Funktion der Spannung k_{max} auf, von der aus das Präparat entdehnt wird, so erhält man das Kurvenbild der Abb. 3 a. $\Delta k'$ steigt proportional der Spannung k_{max} an. Verfolgt man den zeitlichen Verlauf des Spannungsanstiegs nach einer Entdehnung, so ergibt sich das Kurvenbild der Abb. 3 b.

7. Der Wiederanstieg der Spannung erreicht in dem untersuchten Temperaturbereich ($6-10^\circ\text{C}$) in den Kontrakturversuchen in 1,1 sec das Maximum (Abb. 3 b). Das Maximum tritt früher auf als das Maximum der Einzelkontraktion, das unter den gleichen Bedingungen nach 2,2 sec erreicht ist. Abb. 4 zeigt ein Beispiel, in dem von demselben Spannungsniveau der Muskel a) im Zustand der Kontraktur, b) im Ruhezustand und c) im Gipfel der Einzelkontraktion entdehnt wird. Der Wiederanstieg der Spannung $\Delta k'$ innerhalb 1 sec ist im Fall c) größer als in b), in a) größer als in c).

Diskussion

1. Der langsame Anstieg der Kontrakturspannung in den verschiedenen Lösungen beruht auf der verzögerten Diffusion der Ionen in das Muskelinnere. Eine Beschleunigung des Vorgangs wäre nur bei Einzelfaserpräparaten möglich, wie sie *Hodgkin* und *Horowicz* (1960) am Skelettmuskel durchgeführt haben. Eine Präparation von Einzelfasern des Herzmuskels ist jedoch aus anatomischen Gründen ausgeschlossen.

2. Die Kontraktur beruht bei gleichbleibendem Ca^{++} -Gehalt (Lösung B) auf der Dauerdepolarisation der Membran (s. *Reichel* 1960), bei gleichbleibendem K^+ -Gehalt (Lösung D) auf der direkten Aktivierung der kon-

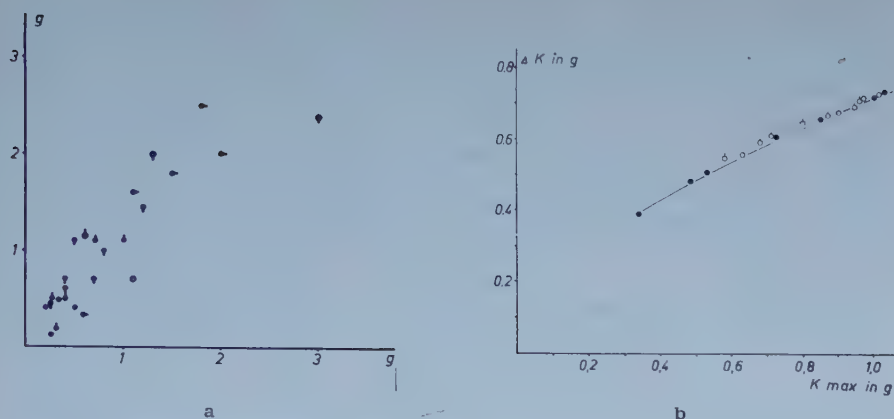


Abb. 2 a. Verhältnis der isometrischen Gipfelspannung von Kontraktur (Ordinate) und isometrischer Einzelzuckung (Abszisse).

1. Lösung A (0,765 % KCl + 10 cm³ CaCl₂ 0,5 %): offene Kreise ohne Marke.
2. Lösung B („Mod. BBH-Lösung“, statt NaCl äquimolare Menge KCl): geschlossene Kreise ohne Marke.
3. Lösung C (1,53 % KCl + 1 ccm einer 2 % CaCl₂/100): geschlossene Kreise mit Abstrich.
4. Lösung D („mod. BBH-Lösung“, statt NaCl äquimolare Menge CaCl₂): geschlossene Kreise mit Aufstrich.
5. Lösung E (Dinitrophenol): offene Kreise mit Aufstrich.
6. Lösung F (isoton. CaCl₂-KCl-Lösung): offene Kreise mit Abstrich.
7. Lösung G (isoton. KNO₃-Ca(NO₃)₂-Lösung): geschlossene Kreise mit rechter Marke.

Abb. 2 b $\Delta K/\Delta l$ -Werte (Steifheiten, bzw. reciproke Werte der Dehnbarkeit) in Ruhe (geschlossene Kreise), während einer Einzelkontraktion (offene Kreise mit Marke) und der Kontraktur (offene Kreise ohne Marke). Längenänderung $\Delta l = 1,5\%$ der Bezugslänge l_0 . Temperatur 6,2°C. Vorhofstreifenpräparat von *Testudo Graeca*. Kontraktilösung C (1,53 % KCl + 1 ml einer 2 % CaCl₂/100).

traktilen Strukturen durch die eingedrungenen freien Ca⁺⁺-Ionen (s. Lüttgau und Niedergerke 1958). Die Kontrakturen bei den Lösungen A, C, F und G kommen durch gleichzeitige Wirkungen der depolarisierenden K⁺-Ionen und direkt aktivierenden Ca⁺⁺-Ionen zustande; die Kontraktur in der Lösung E (DNP + KCl) entzieht sich zunächst einer Deutung.

3. Entsprechend den Befunden von Hodgkin und Horowicz (1960) an Skelettmuskelfasern liegt unter günstigen Diffusionsbedingungen die Kontrakturenspannung höher als die der Einzelzuckung. Dabei muß die Kontrakturenspannung davon abhängen, wie weit die Kontraktilösung ins Innere des Muskels einzudringen vermag, bevor sich die Kontraktur wieder löst (s. u.). Wahrscheinlich enthalten alle Präparate Schichten, die sich zu einem gegebenen Zeitpunkt an der aktiv erzeugten Spannung nicht beteiligen. Sehr hohe Kontrakturenspannungen würden dafür sprechen, daß die Dicke dieser Schichten relativ klein ist, sehr kleine Kontrakturenspannungen (< Spannungen der Einzelkontraktion) für den umgekehrten Fall.

4. Die Lösung der Kontraktur nach einiger Zeit trotz fortdauernder Depolarisation der Membran beruht nach derzeitigen Anschauungen auf einer Entkoppelung zwischen Membranprozeß und Kontraktionsvorgang. Die vorzeitige Abnahme der Kontrakturenspannung bei geringen Ca⁺⁺-Kon-

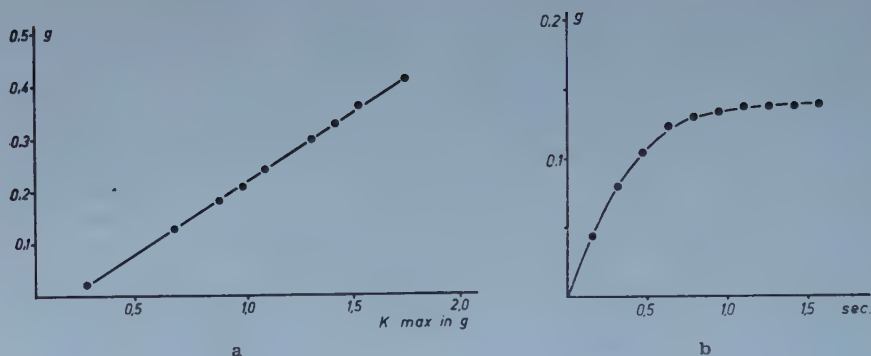


Abb. 3 a Ordinate: Differenz $\Delta k'$ der Spannung, die der Herzmuskel eine Sekunde nach einer schnellen Entdehnung während der Kontraktur erreicht und der Spannung, auf die er sich in derselben Zeit nach einer Entdehnung im ruhenden Zustand einstellt. Abszisse: Spannung k_{\max} , von der aus der Herzmuskel entdehnt wird. Längenänderung Δl 1,5 % der Bezugslänge l_0 . Temperatur 5° C. Vorhofstreifenpräparat von *Testudo Graeca*. Kontrakturelösung F (isotonische CaCl_2 -KCl-Lösung).

Abb. 3 b. Aktiver Wiederanstieg ($\Delta k'$) der Spannung nach schneller Entdehnung während der Kontraktur (Lösung G: isoton. KNO_3 - $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) als Funktion der Zeit. ($\Delta k'$ = Differenz zwischen den in jedem Zeitpunkt gemessenen Spannungswerten und den Werten, die der ruhende Muskel im selben Zeitpunkt nach der Entdehnung erreicht hätte). Längenänderung Δl 1 % der Bezugslänge. Vorhof - Streifenpräparat von *Testudo Graeca* bei 6° C. Ordinate $\Delta k'$ in g; Abszisse Zeit in sec.

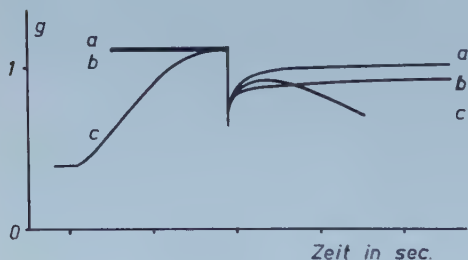


Abb. 4. Spannungsabfall Δk und Wiederanstieg der Spannung nach schneller Entdehnung während des Anstiegs einer isometrischen Kontraktur (a), beim ruhenden Muskel (b) und im Gipfel einer isometrischen Einzelkontraktion (c) bei derselben Spannung k_{\max} vor der Entdehnung und bei konstanter Längenänderung Δl 1 % der Bezugslänge l_0 . Temperatur 10° C. Ventrikelstreifen von *Rana esculenta*. Kontrakturelösung: F.

zentrationen, die lang andauernde Kontraktur bei hohen Ca^{++} -Konzentrationen ist ein weiterer Beweis für die allgemeine Annahme, daß Ca^{++} -Ionen ein wichtiges Kopplungsglied zwischen Membran und kontraktile Substanz sind (s. Lüttgau und Niedgerke 1958).

5. Die Übereinstimmung der dynamischen Δk_{dyn} -Werte im Kontraktur- und ruhenden Zustand bestätigt frühere Ergebnisse, nach denen die Dehnbarkeit des Herzmuskels sich während der Kontraktion nicht ändert (s. Reichel 1960). Die im Zustand der Kontraktur erhobenen Befunde beweisen denselben Tatbestand. Da die Beziehung $\Delta k_{\text{dyn}}/k_{\max}$ über den ganzen untersuchten Spannungsbereich konstant bleibt, auf jedem Spannungs-

niveau aber der aktive Querschnitt ein anderer ist, muß die Dehnbarkeit ($\Delta l/\Delta k$) unabhängig von dem „tragenden“, für die Elastizität verantwortlichen Querschnitt sein, entsprechend ähnlichen Befunden von *Reichel* und *Bleichert* (s. *Reichel* 1960).

6. Der Wiederanstieg der Spannung $\Delta k'$ nach der Entdehnung entspricht der als „Aktivierung“ bezeichneten Nachkontraktion, wie sie *Reichel* und *Bleichert* (1959) im Laufe von Einzelzuckungen beobachtet haben. Im Zustand der Kontraktur ändert sich jedoch in der kurzen Zeit des Wiederanstiegs der Spannung der Depolarisationsgrad nicht (im Gegensatz zu der fortschreitenden Repolarisation während der Einzelzuckung). Der $\Delta k'$ -Wert muß daher bei einer gegebenen Dauerdepolarisation konstant bleiben und ein Maß für die Gesamtspannung k_{\max} sein. Der zusätzliche Spannungsanstieg $\Delta k'$ ist ebenso von der Größe des aktivierten Querschnitts abhängig wie die isometrische Gesamtspannung k_{\max} . Mit der Diffusion der Lösung in das Innere nehmen beide Größen in gleichem Ausmaß zu. Erreicht die Kontrakturenspannung den Gipfelwert der Einzelzuckung, so ist zwar noch nicht der ganze Querschnitt aktiviert, aber der $\Delta k'$ -Wert bereits größer als nach einer Entdehnung, die im Gipfel der Einzelkontraktion erfolgt. Dieser Unterschied läßt sich erklären, wenn man nach den Befunden von *Reichel* und *Bleichert* (1959) den Wiederanstieg der Spannung als einen Vorgang auffaßt, der von dem Depolarisationszustand der Membran abhängt. Auf dem Gipfel der Einzelkontraktion ist die Repolarisation schon so weit fortgeschritten, daß das Potential nur noch 70—80 % des ursprünglichen Spitzenpotentials beträgt. Im Zustand der Kontraktur ist aber das ursprüngliche Potential noch vollständig erhalten; die Entdehnung aktiviert daher die kontraktile Substanz stärker als auf dem Gipfel der Einzelkontraktion. Diese verstärkte Aktivierung findet nicht nur in der Amplitude, sondern auch in der größeren Geschwindigkeit des Spannungsanstiegs nach der Entdehnung ihren Ausdruck, ebenso in der relativ kurzen Anstiegszeit der Nachkontraktion. Dabei ist es gleichgültig, ob die Kontraktur durch eine Depolarisation der Membran oder eine unmittelbare Wirkung freier Ca^{++} -Ionen auf die kontraktile Proteine ausgelöst wird. Die zusätzliche Verkürzung nach einer Entdehnung ist also unabhängig von der Art des Mechanismus, der die kontraktile Strukturen aktiviert hat (Membrandepolarisation oder Ca^{++} -Überschuß).

Zusammenfassung

Im Zustand der isometrischen Kontraktion antworten Herzmuskelpräparate von Frosch und Schildkröte auf eine schnelle Entdehnung mit einem Spannungsanstieg, der auf den elastischen Spannungsabfall nachfolgt. Der Spannungsanstieg ist proportional dem Spannungsniveau, von dem aus der Muskel entdehnt wird; er ist unter sonst gleichen Bedingungen größer als der Spannungsanstieg bei einer Entdehnung im Gipfel der Einzelkontraktion und beruht auf einer zusätzlichen Aktivierung der kontraktile Elemente. Diese Aktivierung kann ebenso wie die Kontrakturenspannung (je nach der Zusammensetzung der verwandten Lösungen) an eine Depolarisation der Membran oder

an eine Anreicherung mit freien Ca^{++} -Ionen gebunden sein. Der elastische Spannungsabfall nach einer Entdehnung ist während der Kontraktur auf dem gleichen Spannungsniveau ebenso groß wie im Ruhezustand.

Schrifttum

- Barkan, G., Ph. Broemser u. A. Hahn, Zschr. Biol. **74** (1922): 1 — Fleckenstein, A., Der Kalium-Natriumaustausch als Energieprinzip im Muskel und Nerv. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955 — Hill, A. V., Proc. Roy. Soc. Biol. **135** (1949 h): 446 — Hodgkin, A. L. u. P. Horowicz, J. Physiol. **153** (1960): 404 — dies., J. Physiol. **153** (1960): 386 — Lüttgau, H. C. u. R. Niedgergerke, J. Physiol. **143/3** (1958): 486 — Reichel, H., Muskelphysiologie. Berlin-Göttingen-Heidelberg 1960 — Reichel, H. u. A. Bleichert, Nature **183** (1959): 826 — Reichel, H., A. Bleichert u. F. Zimmer, Zschr. Biol. **108** (1956): 188 — Ritchie, J. M., J. Physiol. **126** (1954 c): 155 — Rössel, W., Pflügers Arch. ges. Physiol. **253** (1951): 222.

*Aus dem Histologisch-Embryologischen Institut der Universität Lausanne
(Schweiz)*

(Direktor: Prof. Dr. med. Otto Bucher)

Zur Frage der Angriffspunkte des antidiuretischen Hormons in der Niere

Von O. Bucher und Ph. Grandjean

Mit 1 Abbildung

Eingegangen am 17. August 1961

I. Einleitung

Nach Angabe der Nieren-Physiologen werden vom Wasser des Glomerulusfiltrates rund 85 % im Hauptstück und im Überleitungsstück passiv rückresorbiert bei der aktiven Rückresorption von Elektrolyten (insbesondere von Natriumionen), Glukose usw. in isosmotischer Lösung; man spricht auch von einer obligatorischen Wasserrückresorption (*H. W. Smith* 1937). Diese soll ergänzt werden durch eine fakultative, aktive Wasserrückresorption von ungefähr 15 % vor allem im Bereich des Mittelstückes der Nephron: „The evidence favors the belief that facultative reabsorption is confined to the distal portions of the nephron, possibly to the distal segment, though there is reason to believe that the collecting ducts may be involved“ (*H. W. Smith* 1951). Im Gegensatz zur proximalen müßte diese distale Wasserrückresorption — da sie gegen den osmotischen Gradienten erfolgt — Energie und somit eine Arbeitsleistung von seiten der sie durchführenden Tubulusepithelzellen erfordern.

Die fakultative Wasserrückresorption wird bei Mensch und Säugetieren durch das im Hypothalamus neurosekretorisch entstandene und im Hypophysenhinterlappen in das Blut abgegebene antidiuretische Hormon (ADH, Adiuretin) kontrolliert. Dieses würde nach einer heute weit verbreiteten Meinung (s. a. bei *H. W. Smith* 1956) die Fähigkeit haben, die wasserresorbierende Tätigkeit der Mittelstückepithelzellen zu steigern.

Hinsichtlich Wirkungsart und -ort des ADH gibt es aber noch viele unbeantwortete Fragen. Über den Ort der ADH-Einwirkung läßt sich nach dem Übersichtsreferat von *N. A. Thorn* (1958) folgendes festhalten: „As to the location of the action of ADH, the only fairly certain fact seems to be that

it does not work on the glomeruli or on the latter part of the thin limb of Henle... It seems generally accepted that ADH works on the distal convoluted tubules... It may even be possible that ADH works on the proximal tubules" (l. c. S. 180).

Zur Wirkungsweise des ADH äußert sich H. Wirz (1956): „In den distalen Tubuli contorti besteht die Wirkung des antidiuretischen Hormons darin, Poren zu öffnen, und so aus einer wasserundurchlässigen eine wasser-durchlässige Membran zu machen. Einen aktiven Wassertransport im distalen Konvolut anzunehmen, scheint nicht gerechtfertigt, da der osmotische Druck des Tubulusinhaltes nicht über die Isotonie steigt“. Bei Fehlen von ADH würde somit die Wasserpermeabilität vermindert (K. J. Ullrich 1959, O. Heidenreich 1959).

Wie man sich — elektronenmikroskopisch — das „Öffnen von Poren“ vorzustellen hätte, ist eine andere Frage, die wir später einmal studieren möchten.

Wir haben uns nun die Aufgabe gestellt, mit Hilfe der karyometrischen Methode zu untersuchen, ob durch ADH-Verabreichung die Zellaktivität in den Mittelstücken (d. h. in den distalen Tubuli contorti) eine Steigerung erfährt oder ob das nicht der Fall ist. Gleichzeitig haben wir aber auch die Hauptstücke (die proximalen Tubuli contorti) mitberücksichtigt. Das Verhalten der Sammelrohre ist von G. Glimstedt und Mitarbeitern (1952, 1954) bereits beschrieben worden.

Es ist eine den Histologen heute allgemein bekannte Tatsache, daß die Kerne in den arbeitenden Zellen größer sind als in den ruhenden Zellen des gleichen Gewebes (für Beispiele und Literaturangaben siehe bei W. Jacoby 1942, A. Benninghoff 1950, O. Bucher 1953, 1961 a). Man spricht von einer funktionellen Kernschwellung, und diese „kann als Indikator für den Tätigkeitszustand der Zelle benutzt werden“ (Benninghoff). Die Anwendung dieses Erkenntnis auf histophysiologische Untersuchungen der verschiedenen Abschnitte des Nephrons ist seinerzeit von O. Bucher (1953) vorgeschlagen worden und hat sich inzwischen in einer Reihe von Arbeiten bewährt (vgl. J.-A. Antonioli 1960, O. Bucher 1960 und 1961 b, Bucher und Gailloud 1958, D. Djelali 1959 a und b, Cl. Gailloud 1958, Ph. Grandjean 1962, I. Kolb 1961).

Um nun die Wirkung des ADH experimentell zu studieren, haben wir folgende zwei Möglichkeiten: 1. Wir können die Tiere dursten lassen, wobei der osmotische Druck des Blutes ansteigt und endogen die Sekretion von ADH erhöht wird, um die Wasserrückresorption zu steigern (Wassereinsparung). 2. Wir können aber auch von außen her ADH durch Injektion zuführen. Wir haben diesen zweiten Weg beschritten. Dabei ist es zweckmäßig, die ADH-Einspritzung mit einer Wasserverabreichung zu kombinieren, damit die Rückresorption besonders stark wird. Bei Wasserüberladung allein, ohne gleichzeitige exogene ADH-Gabe, kommt es infolge der verstärkten glomerulären Filtration und der verminderten tubulären Rückresorption zu einer physiologischen Wasserdurese; bei kombinierter Wasser-Adiuretin-Applikation wird diese Diurese gebremst,

so lange das injizierte ADH seine Wirksamkeit beibehält, und die karyometrische Auswertung wird uns zeigen können, ob und gegebenenfalls welche Nephronzellen durch das Hormon aktiviert worden sind.

II. Untersuchungsgut und Durchführung der Versuche

Unsere Versuche sind mit 26 männlichen reinrassigen weißen Mäusen durchgeführt worden, die etwa 6 Monate alt und annähernd 30 g schwer waren. Die Wasserüberladung betrug 5 ml je 100 g Körpergewicht; das Wasser wurde mit der Magensonde gegeben. Das ADH — „Pitressin“ von Parke-Davis — ist in einer Dosierung von 2,5 mE (1 Millieinheit = 0,001 I.E.) je 100 g Tiergewicht, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung (1 mE in 0,1 ml), subkutan eingespritzt worden. Vom Versuchsbeginn an bekamen die Mäuse weder Nahrung noch Trinkwasser.

Der Einfachheit halber werden wir in den folgenden Ausführungen von „H₂O-Tieren“, „H₂O+ADH-Tieren“ und „K-Tieren“ (= Kontrolltieren) sprechen; diese haben Wasser allein bzw. Wasser plus ADH bzw. gar nichts erhalten.

In einem Vorversuch prüften wir die antidiuretische Wirkung der verwendeten ADH-Dosis. Im Hauptversuch, der zwei Tage später stattfand, wurden die Tiere — nach den Ergebnissen des Vorversuches — 2¹/₂, 4 und 6 Stunden, nachdem ihnen Wasser bzw. Wasser plus ADH verabreicht worden war, getötet und die Nieren sofort im Gemisch von *Carnoy* fixiert; ein Teil des Materials wurde für eine noch durchzuführende elektronenmikroskopische Studie nach *Palade* fixiert.

Die histologische Verarbeitung der für die karyometrische Untersuchung vorgesehenen Nierenrindenfragmente erfolgte nach einem genau definierten Plan, um methodisch bedingte Kerngrößenunterschiede auszuschließen (vgl. z. B. O. Bucher 1959). Die karyometrische Auswertung geschah in üblicher Weise (s. Cl. Gailloud, J.-A. Antonioli u. a.) und betraf je 1500 Zellkerne von Haupt- und Mittelstück der Nephrene.

III. Beschreibung und Besprechung der Resultate

A. Vorversuch

Im Vorversuch zum Studium der diuretischen Wirkung der Wasserüberladung und des diuretischen Einflusses von ADH ist die Menge des stündlich ausgeschiedenen Urins bestimmt worden (für Einzelheiten siehe bei Ph. Grandjean 1962).

Das in Abb. 1 wiedergegebene kumulative Stäbchendiagramm — erhalten durch Aufsummieren der stündlich produzierten Harnmengen — zeigt die von Versuchsbeginn an bis zu der auf der Abszisse angegebenen Stunde des Experimentes ausgeschiedene Urinquantität in Prozenten des zugeführten Wassers (Mittelwerte von je 10 Mäusen, denen nur Wasser bzw. gleichzeitig Wasser plus ADH verabreicht worden ist). Bei den

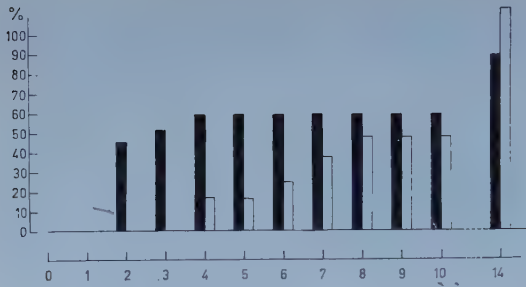


Abb. 1. Diureseversuch. Kumulatives Stäbchendiagramm der ausgeschiedenen Urinmenge in % des zugefügten Wassers (Ordinate); auf der Abszisse ist die Versuchsdauer in Stunden aufgetragen. Schwarze Rechtecke: 10 Tiere mit Wasserüberladung allein; weiße Rechtecke: 10 Tiere mit kombinierter Wasser-ADH-Verabreichung.

Tieren mit Wasserüberladung allein beginnt die Diurese in der zweiten Stunde und ist nach vier Stunden mit 59% ausgeschiedener Flüssigkeit für viele Stunden praktisch abgeschlossen.

Bei den mit ADH behandelten Mäusen kommt die Diurese erst in der vierten Stunde nach dem Beginn des Experimentes in Gang (17%). Nach 8 Stunden ist der Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen weitgehend ausgeglichen.

Die zwischen der 10. und 14. Versuchsstunde, d. h. zwischen 19 und 23 Uhr erhöhte Diurese mag zum Tageszyklus in Beziehung stehen (s. a. *F. Sjöstrand* 1944, *I. Kolb* 1961, *Bucher, Kolb und Juhasz* 1961). Wir wollen dieser Frage in der vorliegenden Arbeit nicht weiter nachspüren, da sie unseren nur 6 Stunden dauernden Hauptversuch nicht berührt.

Die angegebenen Prozentzahlen haben nur Vergleichswert; sie sind insofern nicht ganz genau, als der in den Urinsammelgefäßen eingetretenen Verdunstung nicht Rechnung getragen wurde.

Analoge Versuche sind von *J. Tripod, C. Brüni und R. Meier* (1955) an Ratten durchgeführt worden. Dort begann die Harnausscheidung schon nach 45 Minuten bei den mit Wasser belasteten Tieren und nach 105 Minuten bei den Tieren, die zusätzlich noch ADH (auch 2,5 mE je 100 g Körpergewicht) erhalten hatten. Zeitlich besteht somit ein deutlicher Unterschied im Verhalten von Mäusen und Ratten (diese Fragestellung verdiente eine weitere Untersuchung).

Für uns sind die Resultate des Vorversuches insofern von Bedeutung, als wir jetzt den Hauptversuch sinngemäß planen können: Die Mäuse, die 2 bis 3 Stunden nach Versuchsbeginn getötet werden, müssen große Differenzen in der tubulären Rückresorption von Wasser aufweisen, je nachdem ob sie auch ADH erhalten haben oder nicht; nach 4 Stunden hat die Diurese in den „H₂O+ADH-Tieren“ ebenfalls eingesetzt; nach

6 Stunden hat das eingespritzte ADH seine Wirkung offenbar weitgehend verloren (s. a. S. E. Dicker und A. L. Greenbaum 1954), und es besteht nun noch ein gewisser „Nachholbedarf“ in bezug auf die Wasserausscheidung in den „H₂O+ADH-Mäusen“.

B. Hauptversuch

Die karyometrische Auswertung beschränkt sich auf die im Rindenlabyrinth der Niere gelegene Pars contorta von Haupt- und Mittelstücken (Tubuli contorti I und II oder proximale und distale Tubuli contorti). Die Zellkerne der Mittelstücke sind immer kleiner als die der Hauptstücke (s. a. Cl. Gailloud 1958, O. Bucher 1959, D. Djelali 1959 b). Alle ermittelten Kerngrößen-Frequenzkurven sind Normalverteilungen. Die wesentlichsten Befunde (\bar{x} = mittlere Kerngröße, s = mittlere Abweichung, σ = Stichprobenfehler des Mittelwertes) sind in der Tab. 1 zusammengestellt.

Es ist nicht unsere Absicht, die Einzelheiten der verschiedenen Kerngrößen-Frequenzkurven zu beschreiben (dafür siehe Dissertation *Grandjean*); hier sollen nur die grundsätzlich wichtigen Befunde herausgeschält werden.

Die für die Kerngrößen angegebenen Zahlen sind mm² und betreffen die bei 2300 facher linearer Vergrößerung gezeichneten und dann planimetrierten Projektionsflächen (für methodische Einzelheiten siehe O. Bucher 1950 oder 1954). Zum Stichprobenfehler des Mittelwertes (σ , „Standard error of the mean“) mag noch in Erinnerung gerufen werden, daß zwischen \bar{x}_a und \bar{x}_b ein statistisch gesicherter Unterschied dann besteht, wenn sich die beiden Zonen $\bar{x}_a \pm 2 \sigma_a$ und $\bar{x}_b \pm 2 \sigma_b$ nicht berühren; überschneiden sie sich, so besteht keine signifikante Abweichung.

Tabelle 1

Zusammenstellung der aus Haupt- und Mittelstücken der Nieren verschieden behandelte Mäuse ermittelten karyometrischen Resultate (siehe Beschreibung im Text).

\bar{x} = mittlere Kerngröße, s = mittlere Abweichung, σ = Stichprobenfehler des Mittelwertes.

untersuchter Kanälchen- abschnitt	nach Ver- abrei- chung von	Versuchsdauer (Stunden)					
		2 1/2		4		6	
		$\bar{x} \pm 2 \sigma$	s	$\bar{x} \pm 2 \sigma$	s	$\bar{x} \pm 2 \sigma$	s
Haupt- stück	—	127,70 \pm 1,46	12,63				
	H ₂ O	128,98 \pm 2,33	16,43	122,37 \pm 2,10	14,88	135,12 \pm 2,44	17,21
	H ₂ O+ADH	127,35 \pm 2,10	14,85	130,87 \pm 1,96	13,87	136,07 \pm 2,16	15,28
Mittel- stück	—	110,27 \pm 1,31	11,33				
	H ₂ O	108,72 \pm 1,40	9,89	111,10 \pm 2,02	14,30	120,98 \pm 1,67	11,80
	H ₂ O+ADH	108,75 \pm 1,43	10,10	108,70 \pm 1,26	8,92	116,20 \pm 1,52	10,75

1. Hauptstücke

Zwischen den drei Gruppen von Mäusen (unbehandelte „K-Tiere“, mit Wasser überladene „H₂O-Tiere“, mit Wasser plus ADH behandelte „H₂O+ADH-Tiere“) bestehen nach 2½ Stunden in bezug auf das Verhalten der Kerngrößen im gewundenen Teil der Hauptstücke keine gesicherten Unterschiede, obwohl die mittlere Kerngröße in den „H₂O-Mäusen“ etwas größer und in den „H₂O+ADH-Mäusen“ ein wenig kleiner ist als in den Kontrolltieren.

In den mit Wasser belasteten Mäusen sind die Hauptstückkerne 4 Stunden nach Versuchsbeginn eindeutig kleiner, nach 6 Stunden deutlich größer als bei den nach 2½ Stunden getöteten Tieren. Dieses Hin- und Herpendeln der Kerngrößen, dessen funktionelle Erklärung wir den Nierenphysiologen überlassen möchten, steht in Übereinstimmung mit in verschiedenen anderen Arbeiten mitgeteilten Beobachtungen.

E. Schiller (1959) fand bei Ratten 4 Stunden nach einmaliger intraperitonealer Zufuhr von 1 ml Aqua destillata eine geringe Größenabnahme der Hauptstückkerne, nach 18 Stunden eine starke Abnahme und nach 30 Stunden eine deutliche Zunahme der Kerngrößen. In unserem Institut sahen D. Bonetti (1956) bei Mäusen nach 28 Stunden und J.-A. Antonioli (1960) bei Ratten nach 33 Stunden kleinere Kerne. 9 Stunden nach Versuchsbeginn indessen waren die Kerne der Hauptstücke bei Ratten, die in der Zwischenzeit vier subkutane Einspritzungen von 1:3 verdünnter glukosefreier Tyrode-Lösung erhalten hatten, signifikant vergrößert.

Zum Vergleich der Kerngrößen der behandelten Mäuse nach 4- bis 6stündiger Versuchsdauer mit denen der Kontrolltiere wäre einzuwenden, daß deren Nieren nicht zur gleichen Zeit fixiert worden sind. Nach unseren Erfahrungen (vgl. Bucher, Kolb und Juhasz sowie I. Kolb) sind zwischen 11½, 13 und 15 Uhr jedoch keine statistisch gesicherten tageszyklischen Unterschiede in den Hauptstückkernen zu erwarten, wenn diese auch — im unbehandelten Tier — vorübergehend in ihrer Größe ein wenig ab- und nachher wieder zugenommen haben können.

Die nach 4 Stunden getöteten „H₂O-Tiere“ zeigen — immer hinsichtlich ihrer Hauptstück-Kerngrößen — eine signifikante Abweichung von den Kontrollen wie auch von den „H₂O+ADH-Tieren“. In diesen, wo die Diurese eben in Gang gekommen ist, sind die Kerne größer geworden (der Unterschied gegenüber den Kontrollen ist jedoch nicht gesichert). In den „H₂O-Tieren“, wo schon eine starke Wasserausscheidung stattgefunden hat, haben die Kerne den kleinsten Wert des Versuches erreicht.

Wollte man eine wenig anspruchsvolle Deutung dieser Befunde versuchen, so könnte man sagen, daß das antidiuretische Hormon die Hauptstückepithelien in dem Sinne beeinflusst, daß trotz der Wasserüberladung des Körpers ihre Arbeitsleistung im Rahmen der experimentell nicht beeinflussten Tiere bleibt. Es darf auch nicht außer acht gelassen werden, daß während der Wasserdurese die Elektrolytresorption weitergeht.

Nach 6 Stunden besteht zwischen den „H₂O-Tieren“ und den „H₂O+ADH-Tieren“ kein gesicherter Unterschied mehr. Das eingespritzte ADH dürfte seine Wirksamkeit inzwischen weitgehend verloren haben, wie auch aus dem Vorversuch hervorgeht (Abb. 1). Die funktionellen Verhältnisse sind jedoch außerordentlich komplex und qualitativ bestimmt nicht identisch in den beiden Tiergruppen: Nach unserem Diureseversuch haben die „H₂O-Mäuse“ 6 Stunden nach der Verabreichung des Wassers annähernd $\frac{2}{3}$ davon ausgeschieden, die „H₂O+ADH-Tiere“ jedoch erst $\frac{1}{4}$ bis $\frac{1}{3}$. Das schließt aber nicht aus, daß die energetischen Zelleistungen in der gleichen Größenordnung sein können. Zur weiteren Abklärung dieser Frage wären histochemische und ultrastrukturelle Untersuchungen — die jedoch noch ausstehen — von größter Bedeutung.

Unsere bisherigen Befunde erlauben uns daher nicht, auf Einzelprobleme und weitere funktionelle Deutungsversuche einzugehen, so verlockend das auch sein könnte. Andererseits zeigen sie aber eindeutig, daß das ADH, zumindest in einem bestimmten Zeitpunkt, auch die Epithelzellen der Hauptstücke beeinflusst. Die oben zitierte Vermutung (vgl. N. A. Thorn 1958) entspricht somit einer Tatsache.

2. Mittelstücke

Zwischen den Kerngrößen in den gewundenen Teilen der Mittelstücke der drei Gruppen von verschieden behandelten Mäusen bestehen nach 2½ Stunden — wie in den Hauptstücken — keine statistisch gesicherten Abweichungen.

Auch 4 Stunden nach Versuchsbeginn sind noch keine signifikanten Unterschiede aufgetreten, weder im Vergleich mit den schon nach 2½ Stunden fixierten Mäusenieren, noch zwischen den nach 4 Stunden getöteten „H₂O-Tieren“ und „H₂O+ADH-Tieren“.

In den Mittelstücken zeigen somit die Kerngrößen, die wir ja als Indikator für den Aktivitätszustand der Zellen betrachten, keine Änderungen während der Periode der größten Wirksamkeit des ADH. Wir müssen deshalb die These ausschließen, nach welcher das antidiuretische Prinzip des Hypophysenhinterlappens die aktive wasserresorbierende Tätigkeit der Mittelstückepithelzellen zu steigern vermöchte.

Daß im Stadium der starken Diurese die Kerne in den Mittelstücken der „H₂O-Tiere“ nicht an Größe zunehmen würden, war von vornherein als wahrscheinlich anzunehmen. Es ist klar, daß im wasserüberladenen Organismus keine vermehrte aktive Rückresorption stattfindet. Schwerer verständlich ist indessen die Tatsache, daß die Zellkerne in den Mittelstücken der „H₂O-“ und der „H₂O+ADH-Mäuse“ nach sechsstündiger Versuchsdauer eindeutig größer geworden sind. Auch zwischen den „H₂O-Tieren“ und den „H₂+ADH-Tieren“ besteht nun ein gesicherter Unterschied,

wobei in diesen — mit der zur Zeit stärkeren Urinausscheidung — die Kerne kleiner sind als in jenen.

Die karyometrischen Differenzen der Mittelstücke der nach 6 Stunden getötenen „H₂O-“ und „H₂O+ADH-Mäuse“ sind wohl wiederum auf Unterschiede im Tätigkeitszustand der Zellen zurückzuführen. Aber das ADH hat damit direkt vielleicht gar nichts mehr zu tun. Im Sinne eines Interpretationsversuches könnte man sich zum Beispiel vorstellen, daß die fakultative Resorption von Natriumionen, von denen die „H₂O-Tiere“ eine größere Menge verloren haben, in diesen nun erhöht ist (in Haupt- und Mittelstücken). Der ganze Vorgang wird dadurch noch komplizierter, daß ja auch Nebennierenrindenhormone in den Natriumhaushalt eingreifen.

In diesem Zusammenhang interessieren auch die von D. Djelali (1959 b) in unserem Institut erhobenen Befunde, die gezeigt haben, daß in Mäusen nach Adrenalectomie mit der verminderten Natriumrückresorption eine Größenabnahme der Kerne in den Mittelstücken und — noch stärker ausgeprägt — in den Hauptstücken einhergeht.

Nach neunstündiger Wasserüberladung fand J.-A. Antonoli wie in den Hauptstücken auch in den Mittelstücken eine Kerngrößenzunahme.

IV. Schlußfolgerungen

Unsere karyometrischen Untersuchungen, die in einem späteren Zeitpunkt noch durch histochemische und elektronenmikroskopische ergänzt werden sollen, gestatten uns, zur Frage der ADH-Wirkung einen kleinen Beitrag zu leisten. Daneben bringen sie aber auch einige Einzelbefunde, die wir im Moment nicht deuten können.

Was den Ort der Einwirkung des antidiuretischen Hormons betrifft, so ist, nach vierstündiger Versuchsdauer, ein Einfluß auf die Epithelzellen des gewundenen Teils der Hauptstücke (proximale Tubuli contorti) in unseren Experimenten deutlich zu erkennen. In den Mittelstückzellen indessen ist während der ersten vier Stunden keine Änderung des Aktivitätszustandes aufgetreten (s. Tab. 1). Die oft vertretene Meinung, nach welcher das ADH die aktive Wasserückresorption in den Mittelstücken (in den distalen Tubuli contorti) steigern würde, kann daher nicht richtig sein. Wir bestätigen somit die eingangs zitierte Auffassung von H. Wirz, der allerdings — wie er selbst sagt: „etwas willkürlich“ — als distales Konvolut denjenigen Kanälchenteil bezeichnet, der mit der Macula densa beginnt und mit einer Sammelrohrbifurkation endet, d. h. eigentlich zwei Kanälchenabschnitte, welche morphologisch und histochemisch sehr verschiedenen differenziert sind.

Die Ablehnung einer stimulierenden Wirkung des ADH auf den aktiven Wassertransport schließt eine Erleichterung der passiven Rückresorption, die

keine energetische Leistung von seiten der beteiligten Zellen erfordert und karyometrisch nicht faßbar ist, natürlich nicht aus. Für die Sammelrohre wird eine aktive Wasserrückresorption — ohne und unter ADH-Einwirkung — ebenfalls abgelehnt (G. Glimstedt, N. Jonsson und H. R. Rorsman 1954).

Die erwähnten schwedischen Forscher sahen in den Sammelrohren von wasserüberladenen Ratten eine funktionelle Kernschwellung von 41 %, welche sie durch eine erhöhte aktive Elektrolytrückresorption erklären. Eine geringere Kernschwellung (von 29 %) fand sich in den Tieren, welchen Wasser plus Pitressin verabreicht worden war, während durch die Hormoneinspritzung allein keine Kernvergrößerung zustande kam: „This situation contradicts that a facultative reabsorption of water takes place here.“

Die Wirkung des ADH auf die Nierenkanälchen könnte man eventuell in ähnlicher Weise vorstellen wie die, welche es auf die Amphibienhaut ausübt (H. Wirz, K. J. Ullrich): W. H. Sawyer (1951) sowie V. Koefoed-Johnsen und H. H. Ussing (1953) haben gezeigt, daß durch Hypophysenhinterlappenextrakt die Wasserpermeabilität der Frosch- und Krötenhaut erhöht wird, und zu analogen Ergebnissen kamen A. Leaf, J. Anderson und L. P. Page (1958) bei ihren Untersuchungen an der Krötenharnblase. Auch der Durchtritt von Natriumionen wird durch den ADH erleichtert.

Inwiefern unsere oben beschriebenen „schwerer verständlichen Befunde“ ebenfalls mit der Natriumresorption in Beziehung stehen können, soll hier nicht näher erörtert werden. Für eine gewissenhafte Diskussion dieser Fragestellung wäre es notwendig gewesen, auch die Henlesche Schleife zu studieren, die jedoch, was ihren dünnen Teil (Überleitungsstück) betrifft, für eine karyometrische Auswertung nicht geeignet und von diesem Gesichtspunkt aus bisher noch nie untersucht worden ist.

Zusammenfassung

Nach unseren karyometrischen Untersuchungen an Mäusenieren hat das antidiuretische Hormon keine direkte Wirkung auf die Zellaktivität des Mittelstückepithels. Andererseits ist vier Stunden nach Versuchsbeginn ein Einfluß auf die Hauptstückepithelzellen festzustellen.

Summary

According to our caryometric studies on kidneys of mice, in the distal convoluted tubule the antidiuretic hormone has no influence on the cellular activity of the epithelium. On the other hand, we note a reaction of the epithelial cells in the proximal convoluted tubule four hours after the start of the experiment.

Résumé

D'après nos recherches caryométriques sur des reins de souris, l'hormone antidiurétique n'a pas d'influence directe sur l'activité cellulaire de l'épithélium du segment intermédiaire (tube contourné distal). En revanche, on constate, quatre heures après le début de l'essai, une action sur les cellules épithéliales du segment initial (tube contourné proximal).

Schrifttum

- Antonioli, J.-A., Biol. lat. **13** (1960): 369 (Inaug.-Diss. Lausanne 1960) — Benninghoff, A., Anat. Nachr. Stuttgart **1** (1950): 50 — Bonetti, D., Boll. zool. **23** (1956): 639 — Bucher, O., Mikroskopie **5** (1950): 124 — ders., Bull. Micr. appl., 2e série, **3** (1953): 113 — ders., Internat. Rev. Cytol. **3** (1954): 69 — ders., Zschr. mikr.-anat. Forsch. **65** (1959): 180 — ders., Zschr. mikr.-anat. Forsch. **66** (1960): 408 — ders., Biol. lat. **14** (1961a): 1 — ders., Acta morph. Hung. **10** (1961b): 177 — Bucher, O. u. Cl. Gailloud, Bull. schweiz. Akad. med. Wiss. **14** (1958): 254 — Bucher, O., I. Kolb u. P. Juhasz, Med. experiment. 1961 (im Druck) — Dicker, S. E. u. A. L. Greenbaum, J. Physiol. **126** (1954): 116 — Djelali, D., Verh. anat. Ges. **1959** (a): 386 — Djelali, D., Zschr. mikr.-anat. Forsch. **66** (1956b): 96 — Gailloud, Cl., Arch. Anat. Histol. Embryol. **41** (1958): 51 (Inaug.-Diss. Lausanne 1958) — Glimstedt, G., H. R. Johansson u. N. Jonsson, Kungl. Fysiogr. Sällsk. Lund Förhandl. **22** (1952), **13** — Glimstedt, G., N. Jonsson u. H. R. Rorsman, Kungl. Fysiogr. Sällsk. Lund Förhandl. **24** (1954), **1** — Grandjean, Ph., Acta anat. 1962 (im Druck) (Inaug.-Diss. Lausanne 1961) — Heidenreich, O., Zur Physiologie der Niere. Eine Broschürenreihe über die Niere, hgb. v. d. Ciba **2** (1959): 1 — Jacoby, W., Roux' Arch. Entwicklungsmechanik **141** (1942): 584 — Koefoed-Johnsen, V. u. H. H. Ussing, Acta Physiol. scand. **28** (1953): 60 — Kolb, I., Anat. Anz. 1961 (im Druck) — Leaf, A., J. Anderson u. L. P. Page, J. gen. Physiol. **41** (1958): 657; zit. nach K. J. Ullrich 1959 — Sawyer, W. H., Amer. J. Physiol. **164** (1951): 44 — Schiller, E., Verh. anat. Ges. **1958**: 132 — Sjöstrand, F., Acta anat. Suppl. **1** (1944): 1 — Smith, H. W., The physiology of the kidney. Oxford University Press, New York 1937 — ders., The kidney, ebda. 1951 — ders., Principals of renal physiology. ebda. 1956 — Thorn, N. A., Physiol. Rev. **38** (1958): 169 — Tripod, J., C. Brüni u. R. Meier, Arch. int. Pharmacodyn. **101** (1955): 1 — Ullrich, K. J., in „Diurese und Diuretika“ (Ciba-Symposium), Berlin-Göttingen-Heidelberg 1959 — Wirz, H., Helv. Physiol. Acta **14** (1956): 353.

Aus dem Institut für Veterinär-Bakteriologie, Pleven (Bulgarien)

Zur Problematik der biochemischen Empfindlichkeit von *Trichomonas foetus* nach Beeinflussung mit Ultraschall

Von Chr. Petroff

Mit 1 Abbildung

Eingegangen am 20. August 1961

Der Ultraschall hat auf die Mikroorganismen eine abtötende Wirkung, die mit seiner zunehmenden Stärke ansteigt. Maßgeblich sind hierbei die Größe der Mikroorganismen und die Schnelligkeit, mit der die Ultraschallwellen aufeinander folgen ^{1, 3, 4}.

Nach unserer Untersuchung verursachen die Ultraschallwellen die Zerstörung der *Trichomonas foetus* durch Zerreißen ihrer Zellmembran ². Der Grad dieser Wirkung hängt von der Intensität der Wellen ab.

Über eventuelle Wirkung auf *Trichomonas foetus* sind verschiedene chemische Stoffe geprüft ^{6, 7}.

Es wurde festgestellt, daß nach Einfluß von Röntgenstrahlen die Trichomonaden empfindlicher gegenüber der chemischen Einwirkung sind ⁷.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beziehung zwischen Trichomonadenzelle und dem Herbizid Na-Salz der 2-4-Dichlorphenoxyessigsäure vor und nach schwacher Ultraschallbeeinflussung untersucht. Die Herbiziden bilden eine Stoffklasse, die sich meist von der Phenoxyessigsäure ableitet und daher der Heteroauxingruppe nahesteht. Am meisten wird die 2-4-Dichlorphenoxyessigsäure angewandt. Wirksam im Gebrauch sind die freien Säuren, die besser wasserlöslichen Na- und NH_4 -Salze und Ester ^{5, 8}.

Als Versuchsmaterial benutzten wir Kulturen von *Trichomonas foetus* in einem Nährboden nach Goettler in folgender Zusammensetzung: 200 ml inaktiviertes Pferdeserum, 200 000 I. E. Penicillin, 5 g Streptomycin, 10 g Pepton, 3 g Kochsalz, 2 g Natriumphosphat, 20 g Glucose, 1000 ml Wasser. Alle für die Versuche verwendeten Kulturen waren gleichaltrig (48—56 Std.).

In der ersten Versuchsreihe wurde die Wirkung des 2-4-D-Na-Salzes auf die Trichomonaden in einer schon vermehrten Kultur geprüft. Für jedes Experiment haben wir in einem einzelnen Flacon die Kultur der Trichomonaden (je 5 ml) und die entsprechende Menge 2-4-D-Na-Salz gemischt, um die gewünschte

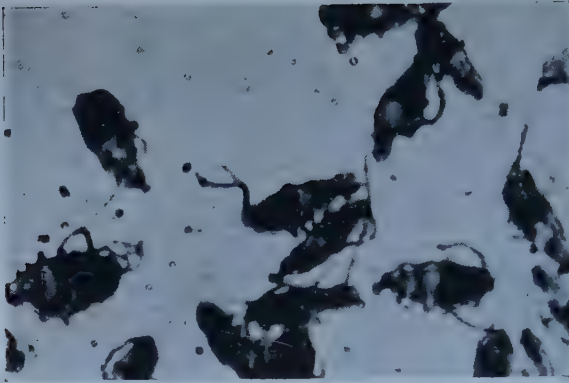


Abb. 1. Normale Kultur von Trichomonaden.

Konzentration zu erhalten. Dann kamen alle Fläschchen in einen Thermostat bei 37° C und wir beobachteten die Trichomonaden, um den Moment des Absterbens festzustellen.

Wir verwendeten zur Durchführung unserer zweiten Versuchsreihe einen Ultraschallapparat nach dem Schema von Schembel, mit dem die Ultraschallwellen nach physoelektrischer Methode erzeugt werden. Sie haben 800 Kiloherz, das sind 800 000 Schwingungen je Sek. mit gleichmäßigem Ausschlag in beiden Richtungen, ohne daß in einem Teil der Welle einzelne Impulse entstehen. Wir arbeiten mit einer Stromstärke von 4 Amp. und mit folgenden Wirkungszeiten: 1-etappig 5 Min., 2-etappig 2 mal je 5 Min. mit Pausen von 5 Min.

Die für Ultraschallbeeinflussung bestimmten Kulturen befanden sich in sterilisierten, 16 × 160 mm großen Gläsern, die mit sterilisierten Wasserstopfen verschlossen waren. Die verwendete Kulturmenge von 5 ml erreichte in den Gläsern eine Höhe von 3 cm und wurde so an den Ultraschallapparat angeschlossen, daß sie mit $\frac{1}{4}$ in das Transformatoröl tauchte. Die Messung der Temperatur des Transformatoröls erfolgte zu Beginn und am Ende des Experimentes.

Nach Abschluß dieser Beschallungen wurden in bestimmten Fläschchen dasselbe Quantum 2-4-D-Na-Salz geschüttet wie bei der ersten Versuchsreihe und die Fläschchen dann wieder im Brutschrank aufbewahrt (37° C).

Die Flacons, welche mit „K“ bezeichnet sind, stellen immer die Kontrolle dar. Hier wurde keine Ultraschallbeeinflussung oder 2-4-D-Na-Salz hinzugefügt.

Die Fläschchen, die mit „K₁“ und „K₂“ bezeichnet sind, zeigen die Kontrolle, in der nur mit Ultraschall gearbeitet worden ist.

Unsere weiteren Beobachtungen sollten die Lebensdauer der Trichomonaden auch in der zweiten Versuchsreihe feststellen.

Ergebnisse

Resultate unserer Serienexperimente „Wirkung des 2-4-D-Na-Salz auf Trichomonaden“:

Aus der Tabelle sieht man klar: Die Lebensdauer der Trichomonaden in den Kontrollen und Experiment-Fläschchen ist fast gleich. Die kleinen Unterschiede liegen noch im Rahmen der Fehler.

Tabelle 1

Nr. des Fläsch- chens	Konzentr. in mg %	Serienexperimente mit 2-4-D-Na-Salz					Durchschn.
		1	2	3	4	5	
K	—	206	201	198	197	196	199,6
1	45	200	203	201	203	198	201,0
2	91	198	196	200	199	202	199,0
3	0,45	196	197	201	198	199	198,2
4	0,91	197	199	200	197	198	198,2
5	4,54	196	189	189	197	196	193,4

Nach der zweiten Versuchsreihe, um die Wirkung der zusammen-
gesetzten Ultraschallbeeinflussung und 2-4-D-Na-Salz auf die Tricho-
monaden zu untersuchen, sind die Resultate in Tabelle 2 aufgestellt:

Tabelle 2

Nr. des Fläsch- chens	Konzentr. 2-4-D-Na mg %	Ultraschall- wirk.-Dauer i. Min.	T. d. Kultur Lebensdauer in Std./Min. \pm 2—30							
			i. Vers.		Serienexperimente					Durchschn.
			Anf.	Ende	1	2	3	4	5	
K	—	—	—	—	210	199	198	208	204	203,8
K ₁	—	5	22	24	186	187	191	186	190	188,0
K ₂	—	2 \times 5	22	26	185	183	181	180	185	184,0
1	45	5	21	23	190	187	190	186	190	184,6
2	45	2 \times 5	21	26	183	181	180	183	183	182,0
3	91	5	21	24	181	184	180	181	180	181,2
4	91	2 \times 5	21	25	180	177	179	177	178	178,2
5	0,45	5	22	24	175	176	176	177	177	176,2
6	0,45	2 \times 5	22	26	170	171	172	173	170	171,2
7	0,91	5	22	24	172	170	171	168	167	169,6
8	0,91	2 \times 5	22	26	166	164	163	165	169	164,4
9	4,54	5	22	24	146	144	146	144	146	145,2
10	4,54	2 \times 5	22	26	120	116	114	112	114	115,2

Die Ergebnisse, die in dieser Tabelle aufgezeichnet sind, zeigen eine
Verkürzung der Lebensdauer der Trichomonaden unter Zusatz von
2-4-D-Na-Salz nach Vorbeschallung mit Ultraschall.

Die erhaltenen Resultate weisen eine Verstärkung (Vergrößerung) der
Empfindlichkeit der Trichomonadenzelle auf chemische Stoffe, in unserem
Falle auf 2-4-D-Na-Salz, nach. Bei schwacher Einwirkung des Ultra-
schalls, wie in unseren Versuchsbedingungen, bleibt die Anzahl der Tricho-
monaden konstant. Einzelne Exemplare zeigen lebhaftige Bewegungen, die
wohl als Abwehrreaktion aufzufassen sind. Die Lebensdauer der schwach
beschallten Trichomonadenzelle ist noch wenig kürzer als in der Kontrolle.
Nach Zusatz von 2-4-D-Na-Salz steigert sich diese Verkürzung der Über-
lebenszeit.

Zusammenfassung

1. Das Natriumsalz der 2-4-Dichlorphenoxyessigsäure (2-4-D-Na-Salz) allein hat fast keine Wirkung auf *Trichomonas foetus*.
2. Auf die beschallten *Trichomonaden*zellen übt das 2-4-D-Na-Salz einen hemmenden Einfluß aus und verkürzt ihre Lebensdauer.
3. Der Ultraschall beeinflusst die Empfindlichkeit der *Trichomonaden* gegenüber dem 2-4-D-Na-Salz. Nach Einwirkung von Ultraschall ist die Empfindlichkeit größer und es erscheint eine spezifische Hemmung nach dem Zusatz von 2-4-D-Na-Salz.

Summary

The Problem of the biochemical Excitability of *Trichomonas Foetus* after Treatment with Supersonant.

In the present work the influence of herbicid-sodium salt of dichlor-phenoxyacetate before and after low treatment with supersonant on *Trichomonas urticles* has been studied.

Dichlorphenoxyacetate alone don't have nearly an effect on *Trichomonas foetus*.

After treatment with supersonant it has an inhibitory effect and shorts the expectation of life.

Résumé

Sur les problèmes de la sensibilité biochimique de *Trichomonas Foetus* après l'action des ultrasons.

1. Le sel de Sodium de la 2-4-dichlorophenoxy aciel-acétique (sel 2-4-D-Na) seul est presque sans effect sur *Trichomonas foetus*.

2. Sur des cellules de *Trichomonades* traitées avec des ultrasons le sel 2-4-D-Na agit réprimant et diminue la durée de la vie.

3. Les ultrasons exercent une influence sur la sensibilité des *Trichomonades* contre le sel 2-4-D-Na. Après l'action des ultrasons la sensibilité est plus grande et il se montre une repression spécifique après addition de sel 2-4-D-Na.

Schrifttum

- 1 Bergman, L., Der Ultraschall. 1949 — 2 Dentscheff, S. u. Chr. Petroff, M. hefte Vet. med. 14 (1959): 496 — 3 Elpiner, J. E., Zschr. Mikrobiol. 21 (1952): 2 — 4 Galaboff, S., Mikrobiol. Jahrbücher 1955, S. 71 — 5 Linser, H. u. O. Kiermayer, Protoplasma 21: 112 — 6 Petroff, Chr., Biol. Zbl. 1961 (im Druck) — 7 ders., Naturwiss. 48 (1961): 553 — 8 Wein, K. L. u. F. Wightman, The Chemistry and Mode of Action of Plant growth Substances. Butterworths scientific publications. London.

Beiträge: Zur Veröffentlichung kommen nur Originalarbeiten und wissenschaftliche Kurzmitteilungen; Buchbesprechungen werden *nicht* aufgenommen. Die Originalarbeiten sollen möglichst 3 Druckbogen und die wissenschaftlichen Kurzmitteilungen 2 Druckseiten nicht überschreiten. Jede Arbeit soll am Schluß eine kurze Zusammenfassung enthalten. — Schriftumangaben sind jeweils an den Schluß der Arbeit zu setzen und zwar einheitlich wie folgt: Nachname des Verfassers, Anfangsbuchstabe des Vornamens, Zeitschrift, **Band**, Jahreszahl, Seite. Bei Schriftumangaben von Büchern folgen auf den Verfasseramen der Titel des Buches, Auflage, Ort, Jahreszahl, Seite. Mit der Übersendung der Niederschrift räumt der Einsender dem Verlag für die Dauer des urheberrechtlichen Schutzes das Recht ein, die photomechanische Vervielfältigung seines Beitrages durch gewerbliche Unternehmen zum innerbetrieblichen Gebrauch zu genehmigen. Die Niederschriften sind möglichst einseitig mit Schreibmaschine zu schreiben. Beigefügte Abbildungen, graphische Darstellungen und Tabellen sollen auf der Rückseite den Namen des Verfassers und der Arbeit aufweisen. Als Vorlagen für die Abbildungen sind scharfe photographische Abzüge oder unmittelbar wiedergabefähige Zeichnungen erwünscht, bei denen im Hinblick auf die starke Verkleinerung auf besonders saubere und große Beschriftung zu achten ist. Die Beigabe von Tabellen soll wegen der hohen Satzkosten möglichst eingeschränkt werden.

Unkosten-Entschädigung: Die Entschädigung für die Aufwendungen des Verfassers beträgt DM 24.— je Druckbogen. Mehr als 3 Druckbogen je Arbeit werden nicht honoriert.

Sonderdrucke: Die Verfasser erhalten gemeinsam 50 Sonderdrucke unberechnet. An Stelle der Unkosten-Entschädigung ist auch die Lieferung von weiteren 50 Sonderdrucken möglich, sofern ihre Bestellung bei Rücksendung der Korrektur erfolgt. Mehr als insgesamt 100 Sonderdrucke können nicht angefertigt werden.

Alle Rechte, auch die des Nachdruckes, der photomechanischen Wiedergabe und der Übersetzung, behalten sich Urheber und Verleger vor. Es ist insbesondere nicht gestattet, ohne Genehmigung des Verlages dieses Heft, einzelne Beiträge oder Teile daraus auf photomechanischem Wege (Photokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

NEU!

Index zum Diabetes mellitus

Eine internationale Bibliographie



Von Prof. Dr. med. et phil. Jos. Schumacher, Direktor
des Medizingeschichtlichen Instituts der Universität
Freiburg i. Br. — 878 Seiten. 1961.

Ganzleinen DM 286,—

Dieses Buch, ein Ergebnis jahrzehntelangen Sammelns, Disponierens und Zusammenstellens, schafft dem Interessierten Zugang zur Weltliteratur einer der wichtigsten Stoffwechselstörungen. Der Index beginnt mit den ersten pharmakotherapeutischen Hinweisen in den bisher erschlossenen Quellen der alten Kulturvölker und erstreckt sich bis zum gegenwärtigen Stand der Forschung.

URBAN & SCHWARZENBERG / MÜNCHEN · BERLIN

NEU!

Physiologie des Zentral- nervensystems

vom Standpunkt der Regelungslehre

Von Prof. Dr. OTTO F. RANKE †

Herausgegeben von Prof. Dr. W. D. KEIDEL,
Erlangen.

32 Abbildungen. 133 Seiten. 1960.

Ganzleinen DM 28.—

Die allgemeinen Grundlagen biologischer Regelkreise werden eingehend und anschaulich dargestellt. Die geschilderten Gesetzmäßigkeiten werden an wenigen, aber typischen vegetativen und zentralnervösen Beispielen erläutert. Spezielle Fühler, nämlich die Sinneszellen, werden zum Schluß aus allgemeiner Sicht behandelt. Das Buch ist *Rankes* wissenschaftliches Vermächtnis.



**URBAN & SCHWARZENBERG
MÜNCHEN - BERLIN**